



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Giovanna Garcia Fagundes**

**ESTUDOS SOBRE OS EFEITOS DE UM PRODUTO À BASE  
DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* EM *Ephestia kuehniella*  
(ZELLER, 1879) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E NO SEU  
ECTOPARASITÓIDE *Bracon hebetor* (SAY, 1836)  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de  
Doutor (a) em Parasitologia.

**Orientador: Prof. Dr. Mohamed Habib**



**Data da Defesa: 23/11/2004**

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. Mohamed Habib (Orientador)**

---

**(Assinatura)**

**Prof. Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade**

---

**(Assinatura)**

**Prof. Dr. Angelo Pires do Prado**

---

**(Assinatura)**

**Dr. Antonio Batista Filho**

---

**(Assinatura)**

**Dr. Jairo Campos Gaona**

---

**(Assinatura)**

**Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro**

---

**(Assinatura)**

**Prof. Dr. Sérgio Batista Alves**

---

**(Assinatura)**

*“Para seguir adiante, devemos reconhecer que no meio da uma magnífica diversidade de culturas e formas de vida, somos uma família humana e uma comunidade terrestre com um destino comum. Devemos somar forças para gerar uma sociedade sustentável global baseada no respeito pela natureza, nos direitos humanos universais, na justiça econômica e numa cultura da paz. Para chegar a este propósito, é imperativo que, nós, os povos da Terra, declaremos nossa responsabilidade uns para com os outros, com a grande comunidade da vida, e com as futuras gerações.”*

*A Carta da Terra*

## **AGRADECIMENTOS**

Inúmeras pessoas contribuíram direta ou indiretamente na construção deste trabalho. A todas deixo registrado o meu reconhecimento e agradecimento, e em especial:

À minha mãe, Irene Raquel, que sempre foi a leoa que povoou minha vida de amor, lições e doses de “pé no chão”, além de ser um exemplo admirável de pessoa e profissional;

Ao meu orientador, Mohamed Habib, por seu apoio nestes 10 anos de convivência, nos quais dividiu comigo seu conhecimento e, especialmente, por sempre ter dado asas para o meu crescimento e aprendizado, sem medo de me deixar aprender com meus erros;

À minha avó, Irene, por seu amor incondicional e sua presença sempre tão importante em todos os momentos da minha vida;

Ao meu avô Gilberto, meu pai de coração, de quem sinto imensa saudade e gratidão;

À minha maravilhosa família (Monique, Bianca, Emmanuelle, Valérie, Toninho, Gutão, Jorge, Bruna, Gutinho, Renatinha, Bárbara Bombom e Betinho) que foi sempre meu porto seguro;

Aos meus tios (Beto, Douglas e Leoni) e, em especial, à Tia Cátia que sempre foi uma grande parceira e amiga;

À minha grande (grande mesmo!!!) amiga e irmã, Mara Cíntia Kiefer, por toda a amizade, carinho, força e apoio nestes anos de convivência, e também pela paciência com o meu jeito “desligado”;

Ao meu super amigo de todas as horas, Heitor Zocchio Fischer, por ter colocado tanta atenção, carinho, alegria e alto astral no meu caminho;

À Maria Helena, Alfredo, “Maras” e Samuel Kiefer por terem me adotado em Campinas e dividido o amor de sua família comigo;

Aos meus amigos e companheiros, Daniel, Fernanda, Luciana Urbano, Ana Tereza, Cacá, Almir, Alexandre, Tiago, Luciana Lisi e Luciana Elisabeth que tornaram mais agradáveis as intermináveis horas de trabalho e me suportaram nas horas de mau humor;

Ao Prof. Dr. Benedicto F. do Amaral Filho e Profa. Eloísa M. do Amaral pela amizade e carinho;

Aos meus amigos, principalmente a: Daniela Bertani, Jeanne Dobgenski, Maria Alessandra, Cláudia G. Gomes, Alessandra R. Pancetti, Ricardo Sawaya, Ana Cláudia Lessinger, Paulo Roberto Checchia, Luciana Cardoso, Rogério de Oliveira Andrade, Heloísa Della Colleta e Márcio Martins, por sempre estarem presentes dividindo bons e maus momentos;

Aos funcionários e docentes dos Departamentos de Zoologia e de Parasitologia pelo auxílio, compreensão e pela amizade;

Ao agrônomo Uemerson da Silva Cunha pelo auxílio prestado;

Ao Prof. Álvaro Eiras (UFMG) pela gentileza de ter me recebido em seu laboratório e auxiliado nos experimentos de olfatometria;

Ao Prof. José Roberto Trigo pelas sugestões;

À Sumitomo Chemical do Brasil Ltda por ter cedido amostras de Dipel PM<sup>®</sup> para a realização deste trabalho;

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou este projeto.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
RESUMO GERAL.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1. Agricultura e Armazenamento.....	01
2. O Ecossistema de Armazenagem.....	03
2.2. Pragas em Ecossistemas de Armazenamento.....	04
2.2.1. <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller, 1879).....	07
2.3. Controle de Pragas em Ecossistemas de Armazenagem.....	13
2.3.1. Controle Biológico Aplicado a Ecossistemas de Armazenagem.....	18
2.3.1.1. Parasitóides.....	18
2.3.1.2. Entomopatógenos.....	20
2.3.1.3. Associação de Parasitóides e Patógenos em Programas de Controle de Pragas.....	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
OBJETIVOS GERAIS.....	39
MATERIAL E MÉTODOS GERAIS.....	41

CAPÍTULO 1 - Susceptibilidade de <i>Ephestia kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) a um produto comercial à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	45
RESUMO.....	45
1.1. INTRODUÇÃO.....	46
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1.2.1. Susceptibilidade de diferentes estádios de <i>E. kuehniella</i> a produto à base de Btk.....	47
1.2.2. Influência do sexo na susceptibilidade de larvas de quinto estágio de <i>E. kuehniella</i> a um produto à base de Btk.....	48
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
1.3.1. Susceptibilidade de diferentes estádios de <i>E. kuehniella</i> a produto à base de Btk.....	49
1.3.2. Influência do sexo na susceptibilidade de larvas de quinto estágio de <i>E. kuehniella</i> a um produto à base de Btk.....	53
1.4. CONCLUSÕES.....	54
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

CAPÍTULO 2 – Efeitos de um produto à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em <i>Ephestia kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	57
RESUMO.....	57
2.1. INTRODUÇÃO.....	58
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.2.1 Avaliação dos efeitos crônicos de um produto à base de Btk em <i>Ephestia kuehniella</i> .....	59
2.2.1.1. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,02%; 0,05% e 0,11%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de <i>E. kuehniella</i> tratadas no primeiro estágio (L1).....	60
2.2.1.2. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,52%; 1,77% e 4,82%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de <i>E. kuehniella</i> tratadas no quinto estágio (L5).....	61
2.2.1.3. Avaliação do efeito de três concentrações de produto à base de Btk sobre a	



reprodução e longevidade de adultos de <i>E. kuehniella</i> oriundos de larvas tratadas com o patógeno por 90 horas, em três estádios larvais.....	61
2.2.2. Efeito direto de produto à base de Btk sobre a longevidade de adultos de <i>E. kuehniella</i> .....	62
2.2.3. Análise dos dados.....	64
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
2.3.1 Avaliação dos efeitos crônicos de um produto à base de Btk em <i>Ephestia kuehniella</i> .....	65
2.3.1.1. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,02%; 0,05% e 0,11%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de <i>E. kuehniella</i> tratadas no primeiro estágio (L1).....	65
2.3.1.2. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,52%; 1,77% e 4,82%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de <i>E. kuehniella</i> tratadas no quinto estágio (L5).....	69
2.3.1.3. Avaliação do efeito de três concentrações de produto à base de Btk sobre a reprodução e longevidade de adultos de <i>E. kuehniella</i> oriundos de larvas tratadas com o patógeno por 90 horas, em três estádios larvais.....	71
2.3.2. Efeito direto de produto à base de Btk sobre a longevidade de adultos de <i>E. kuehniella</i> .....	79
2.4. CONCLUSÕES.....	84
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

CAPÍTULO 3 - Efeitos indiretos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre <i>Bracon hebetor</i> (Hymenoptera: Braconidae).....	89
---	----

RESUMO.....	89
-------------	----

3.1. INTRODUÇÃO.....	90
----------------------	----

3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
------------------------------	----

3.2.1. Mortalidade dos hospedeiros, capacidade de parasitoidismo, capacidade reprodutiva, desenvolvimento da progênie e longevidade de <i>B. hebetor</i> em larvas de <i>E. kuehniella</i> ,	
--	--

submetidas a tratamento com três concentrações de um produto à base de Btk, em dois tempos de exposição .....	91
3.2.2. Efeito direto de formulado à base de Btk na longevidade de adultos de <i>B. hebetor</i> .....	92
3.2.3. Efeito da combinação entre Btk e <i>Bracon hebetor</i> no controle de <i>Ephestia kuehniella</i> .....	93
3.2.4. Análise dos dados.....	94
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
3.3.1. Mortalidade dos hospedeiros, capacidade de parasitoidismo, capacidade reprodutiva, desenvolvimento da progênie e longevidade de <i>B. hebetor</i> em larvas de <i>E. kuehniella</i> , submetidas a tratamento com três concentrações de um produto à base de Btk, em dois tempos de exposição.....	94
3.3.1.1. Mortalidade de larvas de último estágio (L5) de <i>Ephestia kuehniella</i> sujeitas a parasitoidismo por <i>Bracon hebetor</i> após tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	95
3.3.1.2. Capacidade de parasitoidismo de <i>Bracon hebetor</i> em larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	97
3.3.1.3. Capacidade reprodutiva de <i>Bracon hebetor</i> em larvas de último estágio de <i>E. kuehniella</i> sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	99
3.3.1.4. Viabilidade dos estágios imaturos e razão sexual da progênie de <i>Bracon hebetor</i> obtida de larvas de último estágio de <i>E. kuehniella</i> sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	101
3.3.1.5. Longevidade de adultos de <i>Bracon hebetor</i> que receberam como hospedeiras larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	104
3.3.2. Efeito direto de formulado à base de Btk na longevidade de adultos de <i>B. hebetor</i> .....	108
3.3.3. Efeito da combinação entre Btk e <i>Bracon hebetor</i> no controle de <i>Ephestia kuehniella</i> .....	113

3.4. CONCLUSÕES.....	115
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

CAPÍTULO 4 - Capacidade de seleção de <i>Bracon hebetor</i> (Hymenoptera: Braconidae) entre larvas de <i>Ephestia kuehniella</i> sadias e infectadas com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> , em laboratório.....	121
---	-----

RESUMO.....	121
-------------	-----

4.1. INTRODUÇÃO.....	122
----------------------	-----

4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	123
------------------------------	-----

4.2.1. Capacidade de localização de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por <i>Bracon hebetor</i> .....	124
---	-----

4.2.1.1. em olfatômetro de dupla escolha (Tubo de vidro em Y).....	124
--	-----

4.2.1.2. em placas de Petri.....	125
----------------------------------	-----

4.2.2. Aceitação de larvas de último estágio de <i>E. kuehniella</i> , sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por <i>B. hebetor</i> .....	127
---	-----

4.2.3. Análise dos dados.....	127
-------------------------------	-----

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
----------------------------------	-----

4.3.1. Capacidade de localização de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por <i>Bracon hebetor</i> .....	127
---	-----

4.3.1.1. em olfatômetro de dupla escolha (Tubo de vidro em Y).....	127
--	-----

4.3.1.2. em placas de Petri.....	129
----------------------------------	-----

4.3.2. Aceitação de larvas de último estágio de <i>E. kuehniella</i> , sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por <i>B. hebetor</i> .....	130
---	-----

4.4. CONCLUSÕES.....	132
----------------------	-----

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
--------------------------------------	-----

CONCLUSÕES GERAIS.....	135
------------------------	-----



## Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Vista lateral de um casal de <i>Ephestia kuehniella</i> em cópula.....	08
Figura 2. Aspecto de dieta a base de farinha integral, gérmen e farelo de trigo (8:1: 1) após ataque por <i>E. kuehniella</i> .....	08
Figura 3. Farinha retirada da tubulação do moinho Bresway, Campinas, SP, após limpeza da tubulação para controle de <i>Ephestia kuehniella</i> .....	09
Figura 4. Tubulações do moinho Bresway, Campinas, (SP).....	09
Figura 5. Inspeção visual da maquinaria do moinho Bresway, Campinas (SP).....	11
Figura 6. Processo de ensacamento da farinha no moinho Bresway, Campinas (SP) .....	12
Figura 7. Setores de armazenamento e saída da farinha ensacada do Moinho Bresway, Campinas (SP).....	12
Figura 8. Adulto de <i>Bracon hebetor</i> e larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> parasitoidadas pelo braconídeo.....	19
Figura 9. Complexo esporo - cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> em microscopia de fluorescência .....	20
Figura 10. Pote para criação geral de <i>Ephestia kuehniella</i> em laboratório.....	42
Figura 11. Frasco para acasalamento e obtenção de ovos de <i>Ephestia kuehniella</i> .....	42
Figura 12. Larvas de quinto estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> do sexo feminino e masculino..	49
Figura 13. Frascos com casais de <i>Ephestia kuehniella</i> expostos ao contato com Dipel PM <sup>®</sup> em ambiente fechado (A) e ventilado (B).....	63
Figura 14. Frasco para exposição de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> ao odor de Dipel PM <sup>®</sup> e isolados do contato com o produto.....	64
Figura 15. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de machos e fêmeas da <i>Ephestia kuehniella</i> expostos a três concentrações de Dipel PM <sup>®</sup> durante o estágio adulto, em recipiente ventilado.....	80
Figura 16. Longevidade ( $\pm$ E.P.) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> expostos a três concentrações de Dipel PM <sup>®</sup> , em recipiente fechado.....	81
Figura 17. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> expostos ao odor de três concentrações de Dipel PM <sup>®</sup> , em recipiente fechado.....	83

Figura 18. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de machos de <i>Bracon hebetor</i> expostos a larvas tratadas com produto à base de Btk, em três diferentes concentrações, por dois períodos.....	105
Figura 19. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de fêmeas de <i>Bracon hebetor</i> , expostas a larvas tratadas com produto à base de Btk, em 3 diferentes concentrações, por dois períodos .....	105
Figura 20. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de fêmeas adultas de <i>Bracon hebetor</i> expostas a diferentes concentrações de Btk durante o estágio adulto, em recipiente fechado.....	109
Figura 21. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de machos adultos de <i>Bracon hebetor</i> expostos a diferentes concentrações de produto à base de Btk durante o estágio adulto, em recipiente fechado.....	110
Figura 22. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de adultos de <i>Bracon hebetor</i> alimentados com mel contendo produto à base de Btk a 1,77%.....	111
Figura 23. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de adultos de <i>Bracon hebetor</i> tratados com mel, mel contendo Btk (1,77%) e sem alimentação.....	112
Figura 24. Mortalidade média ( $\pm$ E.P.) de larvas de <i>Ephestia kuehniella</i> tratados com diferentes combinações de agentes de controle biológico ( <i>Bracon hebetor</i> e Btk).....	114
Figura 25. Olfatômetro de dupla escolha, em “Y” .....	124
Figura 26. Esquema ilustrativo do experimento de dupla escolha.....	126
Figura 27. Localização por fêmeas de <i>B. hebetor</i> de estímulos olfativos compostos por grumos de farinha com produto à base de Btk (4,82%) e larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , em três tempos de exposição.....	128
Figura 28. Resposta de fêmeas de <i>Bracon hebetor</i> , em situação de dupla escolha, a estímulos olfativos compostos por larvas de <i>Ephestia kuehniella</i> , tratadas por 72h com produto à base de Btk nas concentrações de 0,52% (A), 1,77% (B) e 4,82% (C).....	129

## Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1. Efeito da concentração de produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de primeiro estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , após 90 horas.....	50
Tabela 2. Efeito da concentração de produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de terceiro estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , após 90 horas.....	50
Tabela 3. Efeito da concentração de produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , após 90 horas.....	51
Tabela 4. Valores de CL <sub>30</sub> , CL <sub>50</sub> e CL <sub>70</sub> para larvas de primeiro, terceiro e quinto estágios de <i>Ephestia kuehniella</i> , e seus respectivos intervalos de confiança (IC), após 90 horas de tratamento com produto à base de Btk.....	52
Tabela 5. Mortalidade (em número absoluto) de larvas de último estágio de <i>E. kuehniella</i> de diferentes sexos, submetidas a tratamento com produto à base de Btk por 90 horas.....	54
Tabela 6. Efeitos de três concentrações de produto comercial à base de Btk na viabilidade dos estágios imaturos (%) de <i>Ephestia kuehniella</i> após tratamento no primeiro estágio por 90h.....	66
Tabela 7. Efeitos de diferentes concentrações de produto à base de Btk na viabilidade do estágio imaturo (%) de <i>Ephestia kuehniella</i> , tratada permanentemente a partir do primeiro estágio larval.....	66
Tabela 8. Tempo de desenvolvimento (dias) dos estágios imaturos de <i>Ephestia kuehniella</i> , sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk, por 90h, no primeiro estágio larval.....	67
Tabela 9. Tempo de desenvolvimento (dias) dos estágios imaturos de <i>Ephestia kuehniella</i> , sobreviventes a tratamento permanente com o produto à base de Btk a partir do primeiro estágio larval.....	68
Tabela 10. Viabilidade dos estágios imaturos (%) de <i>Ephestia kuehniella</i> , sobreviventes a tratamento por 90h com Btk no quinto estágio larval.....	69

Tabela 11. Viabilidade dos estágios imaturos (%) de <i>Ephestia kuehniella</i> sobreviventes a exposição permanente a produto à base de Btk a partir do quinto estágio larval.....	70
Tabela 12. Número de ovos/ fêmea de <i>Ephestia kuehniella</i> sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no primeiro estágio larval, durante 90 horas.....	71
Tabela 13. Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) em ovos de fêmeas de <i>Ephestia kuehniella</i> sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk no primeiro estágio larval, durante 90 horas.....	72
Tabela 14. Longevidade (dias) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> oriundos de larvas de primeiro estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base Btk, por 90 horas.....	73
Tabela 15. Número de ovos por fêmea de <i>Ephestia kuehniella</i> , sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no terceiro estágio larval, durante 90 horas.....	74
Tabela 16. Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) de ovos de fêmeas sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk no terceiro estágio larval, durante 90 horas.....	74
Tabela 17. Longevidade (dias) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> obtidas a partir de larvas de terceiro estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base de Btk, por 90 horas.....	75
Tabela 18. Número de ovos/ fêmea de <i>Ephestia kuehniella</i> , sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no quinto estágio larval, durante 90 horas.....	76
Tabela 19. Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) de ovos de fêmeas de <i>Ephestia kuehniella</i> sobreviventes ao tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no último estágio larval, durante 90 horas.....	77
Tabela 20. Longevidade (dias) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> obtidos a partir de larvas de último estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base de Btk, por 90 horas.....	78



Tabela 21. Longevidade média ( $\pm$ E.P.) de adultos de <i>Ephestia kuehniella</i> expostos a Btk puro em frascos fechados e ventilados.....	82
Tabela 22. Mortalidade (%) de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> sujeitas a parasitoidismo por <i>Bracon hebetor</i> após tratamento em três concentrações com o produto à base de Btk, por 24 ou 72h.....	95
Tabela 23. Parasitoidismo (%) de <i>Bracon hebetor</i> em larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , tratadas com três concentrações de um produto à base de Btk, por 24 ou 72h.....	98
Tabela 24. Número de ovos por fêmea de <i>Bracon hebetor</i> mantido com larvas de <i>E. kuehniella</i> tratadas com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.....	100
Tabela 25. Viabilidade dos estágios imaturos (%) e razão sexual da progênie (F1) de <i>Bracon hebetor</i> criado em larvas de <i>Ephestia kuehniella</i> tratadas com produto à base de Btk, em três concentrações e dois diferentes tempos de exposição.....	102
Tabela 26. Tempo de localização por fêmeas de <i>B. hebetor</i> de estímulos olfativos compostos por grumos de farinha integral com produto à base de Btk (4,82%) e larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , em três tempos de exposição.....	128
Tabela 27. Aceitação por <i>Bracon hebetor</i> . de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , tratadas com produto à base de Btk em diferentes concentrações por 24 horas.....	130
Tabela 28. Aceitação por <i>Bracon hebetor</i> . de larvas de último estágio de <i>Ephestia kuehniella</i> , tratadas com produto à base de Btk em diferentes concentrações por 72h.....	131



## RESUMO GERAL

*Ephestia kuehniella* é uma expressiva praga de moinhos de trigo. Seu controle é feito basicamente através de produtos químicos sintéticos. Porém, devido aos inúmeros problemas causados ao ambiente e à saúde humana por estas substâncias, novas alternativas para o manejo deste lepidóptero vêm sendo buscadas. Neste sentido, pesquisas em controle biológico, físico e mecânico, entre outros, são fundamentais para embasar novos programas de manejo integrado (MIP) desta praga. Dentre os agentes de controle biológico, produtos à base do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) e o ectoparasitóide *Bracon hebetor* são considerados altamente eficientes no controle de *E. kuehniella*. Todavia, a inserção destes dois em programas de MIP depende de estudos sobre suas interações na regulação da densidade do pirálídeo. Sendo assim, este trabalho propõe avaliar o impacto e as interações dos dois agentes de mortalidade sobre este pirálídeo. Para tal buscou-se avaliar a susceptibilidade de larvas de *E. kuehniella* ao Btk; analisar os efeitos crônicos de Btk no desenvolvimento dos pirálídeos sobreviventes; avaliar o impacto da patogenia causada pelo Btk nas larvas de *E. kuehniella* sobre o desenvolvimento do parasitóide; analisar possíveis interações de compatibilidade, antagonismo ou sinergismo entre o parasitóide e o entomopatógeno e avaliar a capacidade de *B. hebetor* de distinguir entre larvas sadias e infectadas por Btk. Os estudos foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada, do Departamento de Zoologia da UNICAMP, sob condições controladas ( $25 \pm 2^{\circ}$  C;  $70 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 horas de fotofase). Com os critérios adotados, observou-se que a susceptibilidade de *E. kuehniella* variou inversamente em função do estágio de desenvolvimento larval. Desta forma, larvas de primeiro estágio apresentaram maior susceptibilidade ao produto à base do patógeno ( $CL_{50} = 0,05\%$ ; IC =  $0,04\%$  –  $0,06\%$ ), seguidas pelas larvas de terceiro, que apresentaram um nível intermediário ( $CL_{50} = 0,16\%$ ; IC =  $0,12\%$  –  $0,20\%$ ). Já as larvas de quinto estágio foram as menos susceptíveis ao Btk ( $CL_{50} = 1,77\%$ ; IC =  $1,42\%$  –  $2,23\%$ ). Os estudos de efeitos agudos e crônicos do patógeno sobre o desenvolvimento, reprodução e longevidade de *E. kuehniella* elucidaram o caráter variável da resposta biológica ao tratamento em função da idade larval, da concentração do Btk e do tempo de exposição. Larvas de primeiro (L1) e de quinto estágios apresentaram reduções na viabilidade dos estágios imaturos. Adultos

oriundos de larvas de primeiro e terceiro estádios sobreviventes a tratamento com Btk não apresentaram efeitos crônicos em termos de capacidade reprodutiva e longevidade. Porém, os adultos que se originaram de indivíduos tratados no quinto estágio larval apresentaram menor capacidade reprodutiva. Já a viabilidade dos seus ovos não diferiu do grupo testemunha. A longevidade do piralídeo foi diminuída quando estes adultos foram expostos ao contato direto com o produto microbiano. Este efeito indireto provavelmente foi decorrente do estresse provocado pelo odor do produto. O Btk também foi indiretamente responsável pela redução na capacidade de *B. hebetor* paralisar e parasitar larvas de *E. kuehniella*. Adultos do braconídeo rejeitaram larvas hospedeiras que manifestavam sintomas da bacteriose. A redução da viabilidade dos imaturos do braconídeo variou em função da concentração e do tempo de exposição ao tratamento. Todavia, a longevidade dos adultos obtidos desta F1 não foi alterada. O inseticida microbiano também provocou efeitos indiretos sobre a longevidade dos adultos do braconídeo decorrentes do odor/ contato, com este. A ingestão de mel contendo Btk também diminuiu significativamente a longevidade do ectoparasitóide. Através dos estudos de escolha e olfatometria, pode-se constatar que a localização do hospedeiro por *B. hebetor* não é alterada em função da infecção por Btk. Mas, a aceitação das larvas para o parasitismo variou inversamente à concentração do patógeno e ao tempo de tratamento do hospedeiro. Desta forma, a maior rejeição ocorreu nos lotes onde havia a maior proporção de larvas doentes e manifestando sintomas evidentes da patogenia. Em condições laboratoriais, a ação do patógeno, nas concentrações aqui avaliadas, associada ao parasitóide, para o controle de *E. kuehniella*, apresentou a mesma eficiência que o parasitóide isoladamente. Sendo assim, pode-se concluir que Btk e *B. hebetor* atuam de maneira complementar no controle de populações dessa traça, dependendo de quem a atinge primeiro. Se o programa de MIP visa trabalhar com introduções alternadas desses dois agentes biológicos visando controle de larvas em diferentes estádios, haveria uma vantajosa compatibilidade entre estes, que permite a não utilização de produtos químicos, evita a seleção de resistência pelo Btk na população alvo e contorna o problema gerado pelo número de partículas de insetos presentes em produtos para consumo humano, como as farinhas, decorrente da introdução contínua de parasitóides.

## ABSTRACT

*Ephestia kuehniella* is a very important pest, attacking wheat flour in mills and stored places. Due to the negative impact of the chemical control methods, alternative agents are being studied to reach more safety and more satisfactory results. Some biological, physical and mechanical components should be adequate to be included in integrated pest management programs (IPM) to reduce the injury of this lepidopterous pest. Within the biological agents, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) and the braconid wasp *Bracon hebetor* are considered very efficient in controlling, separately, *E. kuehniella* populations. However, the insertion of these two agents in IPM programs needs some studies concerning the interaction between them and their natural pyralid host. The present study aimed to investigate the interaction between Btk and *B. hebetor*, in addition to evaluate their efficiency in controlling *E. kuehniella*. Within such a purpose some approaches were studied, such as: susceptibility of *E. kuehniella* larvae to Btk; chronic effects of Btk on the survived individuals; effect of diseased and survived *E. kuehniella* larvae on *B. hebetor* development; compatibility between the two biological agents and *B. hebetor* capacity to distinguish between healthy and diseased hosts. All experiments were conducted under controlled laboratory conditions of  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  R. H. and 12 hours of photophase (Department of Zoology, IB, UNICAMP). The pyralid larval susceptibility varied according to the age. The young larvae (L1) showed to be more susceptible than the old ones (L3 and L5). The  $\text{CL}_{50}\text{s}$  were calculated as 0,05%; 0,16% and 1,77% for the first, third and fifth instars respectively. The acute as well as the chronic effects of Btk on *E. kuehniella* development varied according to the exposure time, age and pathogen concentration. Adults originated from survived *E. kuehniella* larvae did not show any biological or structural alterations, when the pathogen was applied against the first and third instar larvae. On the other hand, adults originated from survived 5th instar larvae suffered reduction in their reproductive capacity. The egg viability in all these cases did not reveal any significant differences when compared with testimony block. The direct contact of Btk commercial product resulted in reduced longevity among *E. kuehniella* adults. Reduction in longevity was also detected when *B. hebetor* females were kept in contact with the same product. The braconid female parasite was able to distinguish between healthy and

diseased host larvae, avoiding to attack the later. Parasitization capacity was reduced when the wasp female was able to deposit its eggs in pyralid larvae during the initial phase of the bacterial disease. *B. hebetor* adult longevity was reduced when parasitoid wasps were fed on honey containing Btk. Combinations between the two biological agents did not result in any synergistic effect under the conditions of the present study, and both of them could be recommended to be applied in wheat mills.

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. AGRICULTURA E ARMAZENAMENTO

A agricultura teve início entre 10 e 15 mil anos atrás, de forma independente e concomitante em vários locais geograficamente distintos, e em diferentes condições ecológicas e situações sociais. Possivelmente as primeiras experiências de domesticação de espécies vegetais foram relacionadas a rituais religiosos e ao seu uso medicinal, uma vez que as atividades coletoras garantiam uma base alimentar adequada para as populações humanas existentes naquele período. Posteriormente, com o aumento e dispersão populacional e o processo de fixação à terra, a domesticação de espécies que serviriam como fontes de alimentos, fibras e combustíveis tornou-se mais efetiva (MOONEY, 1987; FOWLER & MOONEY, 1990).

Os centros de biodiversidade primários que originaram a agricultura são denominados centros de Vavilov e estão localizados em países hoje considerados em desenvolvimento. As culturas ali selecionadas foram posteriormente levadas para centros de diversidade secundários, onde os processos de domesticação prosseguiram (HEISER JR., 1977; FOWLER & MOONEY, 1990).

Em paralelo ao início da agricultura, a necessidade de fornecimento contínuo e de previsibilidade no abastecimento de alimentos desencadeou o desenvolvimento de técnicas de armazenagem (GUEDES, 1991). Durante milhares de anos as populações humanas conservaram seus alimentos através de técnicas simples, baseadas em conhecimento empírico, que visavam prevenir infestações por pragas. Escavações em pedras e seladas com argila, potes de barros fechados, escavações em solo argiloso e revestidas por capim, são alguns exemplos destas técnicas (SANTOS, 2000).

Durante a maior parte da sua história as atividades agrícolas e de armazenagem foram sujeitas a variações ambientais que afetavam a disponibilidade da produção para o consumo. Todavia, o transcorrer destes 10 mil anos gerou o desenvolvimento de novos conhecimentos e métodos que procuravam restringir os efeitos negativos do ambiente sobre

a produção e a conservação dos alimentos. Houve uma modificação significativa dos sistemas de produção e armazenagem, assim como das estruturas sociais e dos impactos ambientais diretos e indiretamente associados a estas atividades.

As transformações tecnológicas mais significativas, que permitiram aumentos expressivos na produção, iniciaram apenas a partir dos séculos XVIII e XIX, com a aproximação e combinação entre agricultura e pecuária em grande escala, conhecida como Primeira Revolução Agrícola. Mais tarde, com o advento da Revolução Industrial, houve a possibilidade de se superar as restrições ambientais a que estavam condicionadas as atividades agrícolas devido ao desenvolvimento e adoção de novas fontes exógenas de insumos e energia. Esta Segunda Revolução Agrícola, derivada de avanços científicos, teve como alicerces o uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, o melhoramento genético de plantas e a mecanização utilizando motores de combustão interna. Este padrão produtivo, também conhecido como agricultura “convencional” devido ao alcance mundial e generalizado de sua implantação, intensificou-se após a Segunda Guerra Mundial, atingindo seu ápice na denominada Revolução Verde, na década de 70 (EHLERS, 1999).

No âmbito dos sistemas de armazenamento técnicas naturais e principalmente preventivas foram abandonadas a partir da inserção do controle químico como principal método curativo para o controle de pragas (SANTOS, 2000).

Desta forma, constata-se que as atividades agrícolas partiram de técnicas pouco dependentes de recursos externos ao sistema de produção e armazenagem para um modelo agrícola grandemente dependente de recursos tecnológicos e insumos externos, e que sofre restrições comerciais e de gestão do processo produtivo (ROMEIRO & SALLES FILHO, 1996). A industrialização da agricultura, fruto do processo de modernização, coloca a natureza como subordinada ao capital, o qual liberta o processo de produção agropecuária das condições naturais, passando a supri-las através de insumos e tecnologias, e passa a comprar as mercadorias produzidas (SILVA, 1996).

A agricultura hoje ocupa cerca de 3/5 das áreas terrestres utilizáveis na superfície terrestre (GARCIA, 1999). Apesar do modelo agrícola convencional ter sido responsável por um aumento real na produção (GLIESSMAN, 2000), a expansão das fronteiras agrícolas e as tecnologias empregadas tanto na produção quanto na armazenagem vêm



contribuindo para alterações ambientais marcantes, através da interferência em interações ecológicas, da seleção e manipulação genética de espécies de interesse econômico, da destruição de ecossistemas naturais, da má utilização de recursos não renováveis, da perda de biodiversidade e da geração de poluentes e contaminantes (MATSON *et al.*, 1997). O atual modelo agrícola, que tem como uma das suas bases de sustentação a utilização de insumos químicos, é comprovadamente insustentável por ser dependente de aportes de energia externos ao sistema e de recursos não renováveis (FERRAZ, 1999; GLIESSMAN, 2000)

Apesar de novas técnicas estarem sendo desenvolvidas na intenção da substituição destes insumos dentro do modelo de produção e armazenamento convencional, estas não diminuem o nível de dependência de “*inputs*” de energia no sistema e não vêm corroborando para a real construção das bases de conversão para um novo modelo que englobe técnicas de produção e armazenamento mais sustentáveis quanto possível (ROSSET, 1997).

## **2. O ECOSSISTEMA DE ARMAZENAGEM**

A capacidade de retenção da safra em bom estado para comercialização durante os picos de preço, assim como a manutenção estratégica de estoques reguladores pelo Estado, é de fundamental importância na economia de um país. Pelo menos teoricamente são destinados a garantirem o abastecimento e o acesso regular da população à alimentação, independentemente do tempo e das flutuações climáticas a que está sujeita a produção, e possibilitam a exportação para outros países, o que gera recursos para o país exportador (PUZZI, 1973; CAJUEIRO, 1990).

Unidades armazenadoras (UAs) de produtos e subprodutos agrícolas, como silos, graneleiros e moinhos, podem ser definidos como ecossistemas artificiais onde os processos ecológicos são alterados por intervenções humanas (SINHA, 1995). Segundo ODUM (1984), quatro propriedades distinguem ecossistemas de armazenamento de ecossistemas

naturais: parte da energia que contribui para a produtividade do sistema é derivada de energia fóssil e do trabalho humano ou animal; a biodiversidade é minimizada através do manejo do sistema; plantas e animais dominantes estão sujeitos a seleção artificial; o sistema é controlado visando certos objetivos e não gerando esquemas internos de retroalimentação (“*feedback*”).

Todavia, outras propriedades, que segundo ALTIERI (1987) são características de agroecossistemas, podem ser estendidas a estes ecossistemas: cadeias tróficas simples e lineares, baixa diversidade genética, baixa estabilidade, alta entropia, baixa a média permanência temporal, baixa heterogeneidade de habitats e alta dependência de fontes de energia externas ao sistema.

As UAs representam um sistema estável e homogêneo no que diz respeito a fatores abióticos. Porém, estas propriedades são bastante relativas, visto que há uma grande variação quanto à sua estrutura, composição, complexidade, capacidade armazenadora, limites de tempo de conservação e nível de dependência de energia externa (FIELDS, 1992). Assim, vê-se desde aquelas unidades destinadas à armazenagem de pequenas quantidades de produtos, as quais empregam métodos simples e pouco ou nenhum insumo, garantindo a economia de recursos como energia e petróleo, até aquelas responsáveis pelo acondicionamento de toneladas de produtos e que são totalmente dependentes de fontes de energéticas externas para a manutenção destes em condições adequadas à conservação.

## **2.2. PRAGAS EM ECOSSISTEMAS DE ARMAZENAMENTO**

Apesar de toda a tecnologia empregada nos sistemas de produção e armazenagem estima-se que pelo menos 10% da produção mundial de grãos e de seus subprodutos são perdidos devido a infestações por insetos praga (GALLO *et al*, 1988; LORINI, 1998). A situação é bastante crítica principalmente nos países em desenvolvimento, onde, em geral, o clima, a política de gerenciamento e a estrutura precária de armazenagem, transporte e distribuição favorecem os desequilíbrios populacionais e a dispersão dos insetos entre as unidades do complexo de armazenamento (PEDERSEN & MILLS, 1977; CALDERON,

1981; LONGSTAFF, 1997). No Brasil, admite-se que o percentual de perda durante o armazenamento venha se mantendo na faixa entre 10 e 20% nestes últimos anos (ALMEIDA, 1989; LORINI, 1993; WEBER, 1995). Assim, levando-se em consideração que a estimativa da safra de grãos para 2004 é de aproximadamente 118 milhões de toneladas (fonte: CONAB), pode-se esperar que no mínimo 11,8 milhões de toneladas sejam totalmente perdidas ou inviabilizadas para a utilização.

A biota associada a grãos armazenados, apesar de apresentar baixa diversidade, é altamente especializada e composta por espécies heterotróficas (fungos, bactérias, insetos, ácaros, roedores e aves), (PUZZI, 1973; CALDERON, 1981; DUNKEL, 1992). Segundo MULTON (1988) as interações ecológicas entre a microflora e a microfauna estabelecidas em UAs podem ser consideradas como bastante complexas.

Supõe-se que os insetos associados aos ecossistemas de armazenagem tenham evoluído a partir de espécies predadoras de sementes, brocas de madeira, comedoras de detritos ou necrófagos de ecossistemas naturais. Porém, são poucas as espécies que conseguiram desenvolver estratégias comportamentais e fisiológicas adaptadas às características deste tipo de ambiente (MUNRO, 1966).

As principais pragas de grãos e seus subprodutos têm origem em climas tropicais e subtropicais. Todavia, algumas espécies podem se instalar em regiões de clima temperado devido à capacidade de tolerar baixas temperaturas e de entrarem em diapausa, produzindo novos focos de infestação e dispersão quando existe um favorecimento ambiental (HOWE, 1965; COX *et al.*, 1984; COX, 1987).

A fauna que ataca grãos é basicamente a mesma, independentemente do tipo de ecossistema armazenador (SANTOS, 1993). Esta possui adaptações para a exploração de materiais com baixo conteúdo de umidade, característicos de ecossistemas armazenadores, além de mecanismos altamente eficientes na aquisição e conservação de água. Segundo PEDERSEN & MILLS (1977), somente cerca de 15 espécies de insetos são totalmente adaptadas a desenvolverem-se em grãos íntegros. São as denominadas pragas primárias, as quais são por sua vez categorizadas em internas e externas. A primeira inclui insetos que se desenvolvem dentro do grão, alimentando-se dele e o destruindo. A segunda, inclui as espécies de insetos que se desenvolvem fora do grão, alimentando-se da parte externa

destes, embora esporadicamente possam atacar suas partes internas. Outras poucas espécies possuem adaptações que lhes permitem explorar grãos já danificados pelas pragas primárias, quebrados ou subprodutos destes. São as chamadas pragas secundárias. E uma terceira categoria de pragas, denominada de oportunista, aparece quando as condições de armazenagem são bastante precárias. Estas se alimentam de restos de insetos mortos ou fungos, causando problemas devido principalmente ao aumento no número de partículas de insetos presente na massa armazenada (PUZZI, 1977; GALLO *et al.*, 1988; CAJUEIRO, 1990; SANTOS, 1993).

Os insetos pragas associados a grãos e alimentos armazenados se beneficiam das condições ambientais oferecidas por este ecossistema. Isto, aliado a sua alta capacidade reprodutiva e de sobrevivência, tamanho pequeno que possibilita a penetração na massa armazenada, capacidade de provocar danos diretos ou indiretos, capacidade de evoluir mecanismos de resistência a métodos de controle químico convencional, alto grau de polifagia e possibilidade, em alguns casos, de infestação cruzada, elucida seu alto potencial como praga (AMARAL FILHO, 1986; GALLO *et al.*, 1988; WAIB, 1992).

Entre os vários fatores favoráveis ao crescimento populacional de pragas nas UAs destacam-se: a temperatura e umidade bastante estáveis no decorrer do ano dentro das unidades armazenadoras, o que garante condições bastante favoráveis para a reprodução dos organismos presentes neste ecossistema; a estrutura física inadequada da maioria dos locais de armazenagem, os quais fornecem esconderijos para os organismos durante a limpeza e/ou desinfecção; a concentração de recursos alimentares em grande quantidade; inimigos naturais pouco eficientes em penetrar na massa armazenada, atuando mais superficialmente; poucas espécies competidoras e introdução freqüente de indivíduos provenientes de outras populações, devido ao transporte e falta de medidas sanitárias preventivas para a infestação.

Apesar dos fatores abióticos serem altamente estáveis e homogêneos neste sistema, no que se refere a macroambiente, os insetos possuem a capacidade de produzir alterações a partir do nível microambiental. Suas atividades podem aumentar a temperatura e a umidade da massa armazenada. Geralmente, estas populações possuem um espectro de tolerância bastante estreito a variações desses fatores. Sendo assim, a partir de um certo valor para estes parâmetros, a taxa de crescimento populacional começa a cair e existe o

favorecimento da ocupação deste habitat por outros organismos, como fungos e insetos que os consomem (PUZZI, 1973, 1977, 1986).

Os principais insetos pragas de grãos e produtos armazenados pertencem a duas ordens: Coleoptera e Lepidoptera. Ambas diferem principalmente na capacidade de penetração na massa do item armazenado, sendo que, de maneira geral, as infestações por lepidópteros são mais restritas à superfície da massa armazenada devido ao comportamento de oviposição dos adultos, os quais têm um corpo relativamente grande e asas pouco resistentes e, conseqüentemente, são incapazes de penetrar entre os grânulos dos produtos para ovipôr, como fazem os coleópteros (PUZZI, 1977).

Existem quatro famílias de lepidópteros de importância econômica para a armazenagem de produtos de origens animal e vegetal por terem espécies altamente prejudiciais e com ampla distribuição geográfica. São elas: Tineidae, Oecophoridae, Gelechiidae e Pyralidae (HOLLOWAY *et al.*, 1992). No caso específico de grãos armazenados e seus subprodutos, as espécies de maior impacto negativo pertencem às duas últimas famílias citadas (ALMEIDA, 1989).

### **2.2.1. *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879)**

Dentre as espécies de insetos que atacam produtos e subprodutos armazenados destaca-se o pirálídeo *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Figura 1), popularmente conhecido como mariposa ou traça da farinha (HABIB, 1968; AFIFY *et al.*, 1970).

Como boa parte das pragas associadas a ambientes de armazenagem, este microlepidóptero é considerado polífago, característica que lhe permite explorar uma ampla variedade de alimentos (MUNRO, 1966). Já foi relatado atacando milho, trigo, arroz e amendoim (GALLO *et al.*, 1988). Porém, por ser uma praga considerada secundária, ou seja, que ataca produtos que sofreram algum tipo de quebra na sua estrutura física, não atacando o produto (grão) íntegro (CAJUEIRO, 1990; LORINI, 1998), tem uma preferência acentuada por subprodutos de grãos, como farinha, fubá e farelo (HABIB, 1968; COX, 1987; GALLO *et al.*, 1988). Desta forma, é reconhecidamente uma praga chave em

moinhos de trigo, onde a atividade de produção de seda de suas larvas produz grumos no produto (Figuras 2 e 3), entupindo as tubulações por onde passam os subprodutos derivados da moagem dos grãos (Figura 4) (AMARAL FILHO & HABIB, 1990).



**Figura 1.** Vista lateral de um casal de *Ephestia kuehniella* em cópula (FONTE: <http://www.pherobase.com>).



**Figura 2.** Aspecto de dieta à base de farinha integral, gérmen e farelo de trigo (8:1:1) após infestação por *Ephestia kuehniella*.



**Figura 3.** Farinha retirada da tubulação do moinho Bresway, Campinas (SP), após limpeza para controle de *Ephestia kuehniella*.



**Figura 4.** Tubulações do moinho Bresway, Campinas (SP).

A distribuição geográfica deste pirálídeo é bastante ampla, sendo considerado uma praga cosmopolita (HABIB, 1968; AFIFY *et al.*, 1970). As atividades de exportação e transporte de alimentos são as principais responsáveis por esta característica. No Brasil, AMARAL FILHO & HABIB (1990) destacam que, apesar dos registros referentes ao ataque desta praga se restringirem a quatro estados (Pará, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul), possivelmente ela já ocorra em todo o território nacional. Todavia, não foram encontrados novos registros de sua ocorrência no país.

As infestações por *E. kuehniella* produzem danos mais qualitativos que quantitativos aos produtos. Sua atividade no meio hospedeiro gera condições para o estabelecimento de uma gama de espécies associadas. Estas podem ser tanto benéficas, como agentes de controle biológico (principalmente himenópteros e ácaros predadores), quanto podem gerar efeitos negativos, como no caso de fungos, bactérias e insetos oportunistas. Estas últimas acabam levando a um processo mais acelerado de deterioração e perda de qualidade do produto (HABIB, 1968; AMARAL FILHO, 1986; AMARAL FILHO & HABIB, 1990).

Os moinhos de trigo têm em sua rotina de trabalho, inspeções periódicas da aparelhagem envolvida na seleção, moagem e separação de subprodutos. É nestes locais que se estabelecem os principais focos de infestação de *E. kuehniella* e outros insetos (Figura 5). Geralmente, também são realizadas duas paradas gerais durante o ano para limpeza e desinfecção, onde são utilizados agrotóxicos líquidos e fumigantes, os quais são aplicados a toda estrutura física do moinho (ROBERTO TRIAS, comunicação pessoal).





**Figura 5.** Inspeção visual da maquinaria do moinho de trigo Breswey, Campinas (SP).

O armazenamento de derivados do trigo, como farinhas, farelos e gérmen, ocorre por pequenos períodos de tempo, ao contrário do que ocorre com os grãos. Geralmente a produção destes subprodutos atende a demanda de pedidos do comércio. O tempo de armazenamento no moinho não excede uma semana (Figuras 6 e 7).



**Figura 6.** Processo de ensacamento da farinha no moinho Bresway, Campinas (SP).



**Figura 7.** Setores de armazenamento e saída da farinha ensacada do moinho Breswey, Campinas (SP).

### 2.3. CONTROLE DE PRAGAS EM ECOSISTEMAS DE ARMAZENAGEM

Assim como na agricultura, o método convencional de controle de infestações por insetos em ecossistemas de armazenagem vem sendo o uso de agrotóxicos (LORINI, 1999; SANTOS, 2000; FARONI *et al.*, 2002; CELARO, 2002). Os agentes químicos mais utilizados nestes ambientes são os fumigantes, os quais são considerados altamente eficazes pois produzem vapores tóxicos de alta capacidade de penetração e difusão tanto na estrutura do local de armazenagem quanto no material armazenado, o que permite que as pragas sejam eliminadas de qualquer possível local de instalação desde que este esteja adequadamente vedado (GALLO *et al.*, 1988; BITRAN, 1989; SANTOS, 1993). Seu mecanismo de ação provoca altos níveis de mortalidade em quase todos os estágios de desenvolvimento dos insetos visto que provoca envenenamento pela inalação das substâncias tóxicas liberadas no vapor (PUZZI, 1977).

Porém, assim como outros agentes químicos, os fumigantes são de amplo espectro e baixa seletividade, atingindo inclusive insetos benéficos e desfavorecendo o controle natural das populações alvo. Em adição, tais produtos estimulam a seleção de resistência com seu uso prolongado, provocando posteriores problemas com o aumento das doses aplicadas, as quais implicam na elevação do custo da armazenagem. Outros itens negativos quanto ao seu emprego são: a periculosidade para o aplicador, a contaminação dos produtos tratados com resíduos tóxicos que têm ação patológica, a contaminação ambiental e a perda de valor comercial dos produtos tratados inadequadamente com estes agentes químicos no mercado mundial (ASTOLFI *et al.*, 1977; SARTORI, 1996). Correntes de agricultura alternativa, como a orgânica, proíbem o polvilhamento, pulverização ou fumigação com agrotóxicos sintéticos ou qualquer produto de síntese visando o controle de pragas de produtos armazenados (PASCHOAL, 1994).

Recentemente, vários países cancelaram o registro de alguns tipos de agentes químicos devido às suas excessivas propriedades tóxicas e poluentes. Pode-se citar o exemplo dos fumigantes líquidos, usados para controle de pragas de grãos, proibidos nos mercados norte-americano e canadense a partir de 1984 (FIELDS, 1992).

No Brasil, utilizam-se amplamente dois produtos para expurgos: a fosfina e o brometo de metila, agentes controladores de pragas mais empregados mundialmente em sistemas de armazenagem (TAYLOR, 1994).

O fosfeto de hidrogênio, ou fosfina ( $\text{PH}_3$ ), é classificada como substância inorgânica de exclusiva ação fumigante. Geralmente, é apresentada na forma de comprimidos com uma mistura a base de fosfeto de alumínio e de carbonato de amônio. Ao entrar em contato com a umidade do ar libera gases de fosfina, o anidrido carbônico e o amoníaco, o qual serve como indicador de vazamento já que a fosfina em si é inodora, (ASTOLFI *et al.*, 1977; MARICONI, 1983; GALLO *et al.*, 1988). Outros fosfetos metálicos, como fosfeto de cálcio ou fosfeto de magnésio, também podem formar fosfina (CELARO, 2002).

A atual legislação fitossanitária restringe a utilização da fosfina estabelecendo um limite máximo de resíduo de 0,1 ppm para grãos como o amendoim, arroz, cevada, aveia, feijão milho, sorgo, soja, trigo e café. Para o caso da farinha preparada a partir de grãos, o limite máximo é 0,01 ppm (BITRAN, 1989).

Alguns autores consideraram que a velocidade da seleção de resistência nos insetos de ambientes de armazenagem é menor que em agroecossistemas devido à intensa migração passiva ocasionada pela movimentação dos estoques, menor número de gerações por ano e baixa pressão de seleção, já que os fumigantes funcionam como supressores de populações praga em ambientes de armazenagem (PARKIN, 1965). Todavia, a fosfina tem uma capacidade comprovada de selecionar resistência nos insetos-alvo, além de também provocar intoxicações por inalação e deixar resíduos no ambiente, apesar de sua alta eficiência nas operações de expurgo (PUZZI, 1977; JOHNSON *et al.*, 1995; LEESCH, 1995; SARTORI, 1996).

SARTORI (1996) relata que no período entre 1972/ 73 a FAO não detectou resistência a fosfina em populações brasileiras de algumas espécies de coleópteros. Entretanto, entre 1989 e 1991, num levantamento feito pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), de Campinas/ SP, em oito estados brasileiros, observou-se resistência a fosfina em porcentagens que variavam entre 80% e 100% nas diversas populações das espécies pragas estudadas (SARTORI *et al.*, 1990; SARTORI, 1993, 1996). PARKIN

(1965) aponta as falhas na aplicação, tempo de exposição e vedação do ambiente, entre outros, como os principais responsáveis pela seleção da resistência. Tais fatores também são apontados como críticos no Brasil por SARTORI & LORINI (2002).

O brometo de metila ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ), é um gás incolor em temperatura normal, quase sem cheiro e 3,3 vezes mais pesado que o ar (THOMPSON, 1966; NAKANO *et al.*, 1977; MARICONI, 1983; GALLO *et al.*, 1988). Apesar de eficiente como nematicida, bactericida, fungicida e inseticida, é altamente inespecífico, tóxico e causa danos à camada de ozônio. Sua aplicação contínua em alimentos provoca acúmulo de resíduos de bromo acima dos níveis toleráveis para a saúde, podendo provocar uma intoxicação que atinge os sistemas nervoso e respiratório, inclusive levando à morte (ASTOLFI *et al.*, 1977).

Este fumigante é uma das substâncias citadas no “Protocolo de Montreal sobre Substâncias que destroem a Camada de Ozônio” e sua retirada do mercado é sugerida como meta em curto prazo. Países desenvolvidos teriam até 2005 para a eliminação total do uso deste produto, enquanto os países em desenvolvimento teriam até 2015. Todavia, o governo brasileiro, através da Instrução Normativa nº 1, de 10 de setembro de 2002, assinada em conjunto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determinou um cronograma de eliminação do brometo de metila para todos os seus usos até 31 de dezembro de 2006, sendo a única exceção prevista para os tratamentos quarentenários que deverão ser proibidos apenas em 2015 (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

Como complemento à fumigação, são empregados ainda agrotóxicos em pó ou líquidos, na prevenção de novas infestações. No caso da farinha de trigo são permitidos o uso do malathion e do pirimiphosmetil, com tolerâncias de 2 e 5 ppm, respectivamente (BITRAN, 1989).

A filosofia do Manejo Integrado de Pragas (MIP) foi introduzida, buscando-se eliminar ou ao menos minimizar os impactos negativos decorrentes da aplicação das metodologias do controle de pragas ou controle integrado de pragas. Diferentemente destas últimas, o MIP busca associar métodos compatíveis que sejam economicamente viáveis, ambientalmente seguros e socialmente aceitáveis e que mantenham a população praga

abaixo do seu nível econômico de dano (METCALF & LUCKMAN, 1982). Assim, métodos alternativos aos químicos, como a utilização de agentes de controle biológico, recebem grande destaque dentro destes programas (LONGSTAFF, 1997; SCHÖLLER *et al.*, 1997). Entretanto, o MIP foi incorporado dentro do atual modelo de agricultura, partindo sempre de práticas pontuais de objetivos limitados, não tendo uma visão holística do funcionamento dos sistemas e nem sempre levando em conta as peculiaridades de cada região. Muitos pesquisadores atualmente consideram o MIP como o “manejo inteligente de pesticidas” e questionam as práticas adotadas nestes programas já que se observa que as pragas quase sempre alcançam o nível econômico de dano. Mesmo o controle biológico, hoje adotado no sistema agrícola convencional, vem sendo questionado, pois é praticado como uma forma de substituição aos agentes químicos de controle, não garantindo maior sustentabilidade aos sistemas (JENKINS, 2000).

Devido às recentes preocupações mundiais quanto às atitudes a serem adotadas para a garantia da melhoria da produção agrícola de forma sustentável e para que todos tenham acesso à alimentação adequada e a gêneros alimentícios que sejam culturalmente apropriados, expressas no conceito de segurança alimentar (MALUF, 1995), incluiu-se um capítulo na Agenda 21 (CONFERÊNCIA DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1992) destinado a traçar as metas para a promoção do desenvolvimento rural e agrícola sustentável. E para tal ressalta-se ser básica *“a necessidade de efetuar importantes ajustes nas políticas para a agricultura, o meio ambiente e a macroeconomia, tanto no nível nacional como internacional, nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento”*. Uma das metas propostas aos países envolvidos na adoção da Agenda diz respeito a *“identificar problemas de armazenagem e distribuição que afetem a disponibilidade de alimentos; apoiar a pesquisa, quando necessário, para suplantiar esses problemas, e cooperar com os produtores e distribuidores na implementação de práticas e sistemas melhorados”*.

Desta forma, o setor agrícola encontra-se atualmente diante do desafio de minimizar de maneira sustentável as perdas ocasionadas por insetos pragas tanto durante o cultivo quanto durante os períodos de armazenagem de grãos e de seus subprodutos. Isto implica na adoção de técnicas de manejo nestes ecossistemas que resultem no menor nível de impacto sócio-econômico e ambiental possível. Os métodos utilizados devem levar em consideração a identidade de cada ecossistema e procurar garantir a integridade e

sustentabilidade destes como um todo, prevendo, corrigindo e diminuindo as ações impactantes.

As interações com os ecossistemas que circundam o ecossistema agrícola ou de armazenagem, assim como as interações físicas e biológicas e os ciclos naturais dentro do próprio ecossistema, devem ser reconhecidos e utilizados para a manutenção do seu equilíbrio. Desta forma, os agentes de controle biológico, como predadores, parasitóides e patógenos, devem ter a sua importância reconhecida visto que as interações entre os insetos e seus inimigos naturais são processos ecológicos essenciais que contribuem para a regulação populacional destes primeiros (DENT, 2000).

Apesar de programas de manejo serem muito mais conhecidos pela sua aplicação em agroecossistemas do que em ecossistemas de armazenagem, existem grandes esforços para sua adoção para este último, principalmente devido às restrições impostas ao uso dos principais agentes químicos utilizados no controle de pragas (REICHMUTH, 1996). Segundo LORINI (2002) *“a integração de diferentes métodos de controle é prática essencial para se obter sucesso na supressão de pragas de grão armazenados”*.

O manejo do ecossistema de armazenagem é bastante delicado, pois o nível econômico de dano das suas pragas é bastante baixo. As pragas associadas a grãos e subprodutos armazenados apresentam um elevado potencial reprodutivo, podendo estabelecer uma infestação expressiva em pouco tempo. DUNKEL (1992) ressalta a importância do conhecimento dos componentes de cada sistema específico em questão, das espécies que compõem cada comunidade, sua ecologia, o monitoramento das mudanças sucessionais nas comunidades, da imigração e emigração e a dispersão passiva de indivíduos, para que se possa estabelecer um programa de MIP destinado a ecossistemas de armazenamento.

### **2.3.1. CONTROLE BIOLÓGICO APLICADO A ECOSISTEMAS DE ARMAZENAGEM**

O controle biológico utilizando patógenos, parasitóides e predadores em ecossistemas de armazenagem ainda é uma questão polêmica. Todavia, inúmeros estudos vêm mostrando sua viabilidade (PRESS *et al.*, 1982; REICHMUTH, 1996; SCHÖLLER *et al.*, 1997; FLINN, 1998; PEREZ-MENDOZA *et al.*, 1999; FLINN & HAGSTRUM, 2001; SCHÖLLER & HASSAN, 2001; MENON *et al.*, 2002; HANSEN & JENSEN, 2002; STEIDLE & SCHÖLLER, 2002; NIELSEN, 2003).

#### **2.3.1.1. PARASITÓIDES**

Os insetos parasitóides, principalmente os himenópteros das famílias Braconidae, Ichneumonidae, Pteromalidae e Bethyidae, representam inimigos naturais bastante eficientes como agentes reguladores de populações de espécies prejudiciais em ambientes de armazenagem (PHILLIPS, 2004). Geralmente apresentam alto grau de especificidade, boa capacidade reprodutiva, elevada capacidade de procura, além de total sincronismo bioecológico com o seu hospedeiro (CLAUSEN, 1962; SILVEIRA NETO *et al.*, 1976; BACH, 1981). Assim, estudos sobre a biologia, comportamento e interações de parasitóides são fundamentais para a compreensão de sua história natural, de sua influência na dinâmica populacional de seus hospedeiros e da estrutura da comunidade que fazem parte.

*Bracon hebetor* (Say, 1836) (Figura 8) é um himenóptero com distribuição geográfica cosmopolita, a qual coincide com a distribuição de seus principais hospedeiros. Este micro-himenóptero tem grande importância no controle biológico natural de lepidópteros pragas em ecossistemas de armazenagem, pois exerce o ectoparasitoidismo sobre larvas de várias espécies de pirálídeos que atacam grãos armazenados e seus subprodutos (MAGRO & PARRA, 2001). Destaca-se pelo parasitoidismo freqüente de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, atacando-as freqüentemente em moinhos de farinha (RICHARDS & THOMSON, 1932; HABIB, 1968).





**Figura 8.** Adulto de *Bracon hebetor* e larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella* parasitoidadas pelo braconídeo.

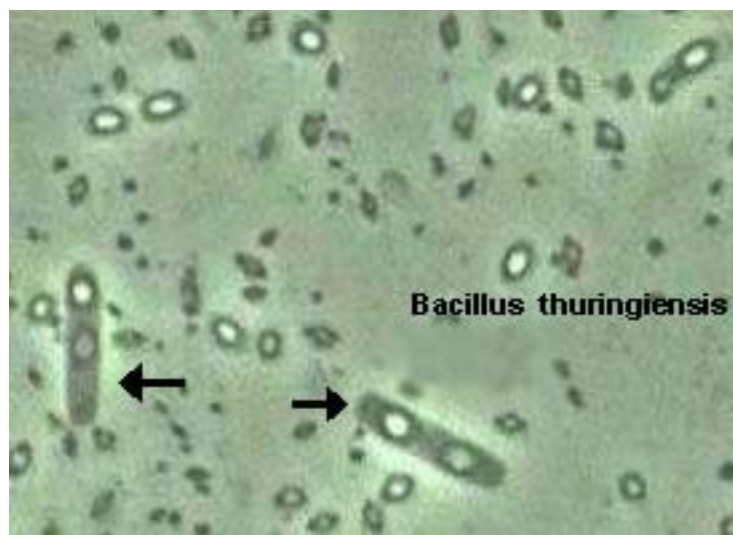
É uma espécie altamente eficiente no parasitoidismo de larvas que estão se alimentando sobre ou próximo à superfície de produtos infestados (TAMASHIRO, 1960; HABIB, 1968; BENSON, 1973, 1974; CLINE *et al.*, 1984; BROWER & PRESS, 1990; SERRA, 1992; CECÍLIO, 1993).

As fêmeas desta espécie causam paralisia permanente no hospedeiro antes da oviposição através da inoculação, pelo ovipositor, de uma substância que age nas junções neuro-musculares. Esta paralisia também possibilita que se alimentem da hemolinfa exudada (RICHARDS & THOMSON, 1932; BEARD, 1972). Além disso, tendem a paralisar o maior número de larvas possível que estejam na sua área, antes de ovipôr (RICHARDS & THOMSON, 1932; CECÍLIO, 1993). Tal fenômeno pode ser considerado como significativo na regulação populacional do hospedeiro, incrementando o efeito do parasitoidismo propriamente dito.

### 2.3.1.2. ENTOMOPATÓGENOS

Entre os agentes entomopatogênicos de maior utilização na agricultura destaca-se a bactéria esporulante *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), empregada no controle de diversas espécies pragas (WATKINSON, 1994). A primeira descrição de *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi realizada por Ishiwata no Japão, em 1903, a partir de larvas doentes de bicho-da-seda, isoladas em 1901 e 1902 (MILNER, 1994). Em 1911, Berliner isolou e descreveu um bacilo em larvas de *E. kuehniella*, na Alemanha. Esse isolado foi posteriormente caracterizado como *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (sorotipo H-1) (HABIB & ANDRADE, 1998).

O Bt é uma espécie cosmopolita, reconhecida pela formação do corpo parasporal, também denominado cristal protéico ou  $\delta$ - endotoxina, durante o processo de esporulação (Figura 9). Já foi isolado em diversos substratos, os quais variam desde solos, superfícies foliares até insetos (DULMAGE & AIZAWA, 1982).



**Figura 9.** Complexo esporo - cristal de *Bacillus thuringiensis* em microscopia de fluorescência (FONTE: [http://www.fsu.edu/~imsp/silent\\_invaders/](http://www.fsu.edu/~imsp/silent_invaders/)).

O Bt produz diversas toxinas que possuem atividade como inseticida, acaricida e nematocida. Entre elas as mais estudadas e com maior destaque são as componentes do cristal protéico e a thuringensina (DRUMMOND & PINNOCK, 1994). Cada um dos diferentes sorotipos do Bt, categorizados de acordo com o antígeno flagelar e parâmetros bioquímicos (BARJAC & BONNEFOI, 1962), é específico a um grupo de espécies que possuem as características genéticas e condições fisiológicas favoráveis ao desenvolvimento da bacteriose (HABIB & ANDRADE, 1998).

A complexidade de inter-relações entre os diversos sorotipos, no que diz respeito ao espectro de atividade do Bt, é atribuído principalmente à capacidade de produzirem cristais com diferentes composições protéicas e, conseqüentemente, um espectro de hospedeiros diferenciado (DRUMMOND & PINNOCK, 1994). Sendo assim, existe a possibilidade de se selecionar o sorotipo específico a ser aplicado para cada espécie de inseto alvo, sem afetar diretamente outros grupos da biota. DULMAGE (1981) forneceu um estudo sobre a atividade de várias linhagens de Bt em 23 espécies de insetos bastante elucidativo quanto ao espectro de hospedeiros do entomopatógeno.

Após a ingestão por um inseto susceptível, o cristal é dissolvido no intestino médio e as pró-toxinas são enzimaticamente quebradas dando origem às toxinas. Estas se ligam a receptores nas células epiteliais do próprio intestino médio criando poros na membrana celular. Tal ação causa expansão e lise celular, resultando em paralisia intestinal e eventualmente resulta em morte do inseto hospedeiro (CHILCUTT & TABASHNIK, 1997). Os insetos podem sofrer toxemia e/ou bacteriose, tendo esta última um efeito letal mais demorado que a primeira (HABIB & ANDRADE, 1998).

Segundo BAUER (1995), o isolamento das proteínas do cristal vem proporcionando o desenvolvimento de vários inseticidas seletivos que possuem como vantagens:

- a. alta compatibilidade com inimigos naturais e organismos não alvo;
- b. inocuidade sobre vertebrados;
- c. biodegradabilidade no ambiente;
- d. alto potencial como fonte de genes para desenvolvimento de plantas transgênicas.

Em relação especificamente à inocuidade a vertebrados, estudos comprovaram aumentos nos níveis de anticorpos em humanos (IgG e IgE), todavia não houve observação de desenvolvimento de doenças decorrentes da exposição ao patógeno (BERNSTEIN *et al.*, 199; SIEGEL, 2001).

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) foi isolado por Kurstaki em 1962, a partir de larvas doentes de *Ephestia kuehniella* coletadas em armazéns de grãos na França (DULMAGE & AIZAWA, 1982). Este sorotipo mostra-se específico para larvas de várias famílias de lepidópteros (DRUMMOND & PINNOCK, 1994). A possibilidade de sua aplicação em ambientes com condições físicas estáveis (U.R. e temperatura), como armazéns e silos, e a susceptibilidade natural de populações de piralídeos a este agente de controle já foram analisados por vários pesquisadores (McGAUGHEY, 1978 a, b, 1980 a,b, 1985; HABIB, 1982; AMARAL FILHO, 1986; HABIB *et al.*, 1991; HABIB & ANDRADE, 1998). Entretanto, o uso contínuo e exclusivo de formulados a base de *Bacillus thuringiensis* em programas de controle de pragas, substituindo o de agrotóxicos, pode, em algumas situações, selecionar resistência nas populações de insetos alvo (TABASHNIK *et al.*, 1990, 1991; McGAUGHEY, 1994; JENKINS, 2000).

Segundo McGAUGHEY (1985), os ecossistemas de armazenamento são ideais para o desenvolvimento de resistência, pois nele o *B. thuringiensis* é estável e pode permanecer por longos períodos permitindo que os insetos se multipliquem por várias gerações em contato com esporos e toxinas da bactéria. Porém, este efeito adverso ocorre quando produtos à base deste entomopatógeno ou exclusivamente à base de suas toxinas são utilizados inadequadamente, apenas substituindo os agrotóxicos. Isto pode ser contornado com a utilização mais racional de produtos à base deste agente patogênico juntamente a outras técnicas compatíveis no manejo do ecossistema.

### 2.3.1.3. COMBINAÇÃO DE PARASITÓIDES E PATÓGENOS EM PROGRAMAS DE CONTROLE DE PRAGAS

A associação de representantes de diferentes categorias de agentes de controle biológico, constituindo sistemas multiespécies com ação combinada, tem recebido atenção dos pesquisadores, procurando-se otimizar as interações dentro do sistema em pauta (McGAUGHEY, 1985; MAGALHÃES *et al.*, 1998). A combinação de patógenos microbianos com parasitóides e predadores é considerada uma das estratégias mais efetivas para programas de manejo integrado de pragas, e vem sendo também adotado para manejo de agroecossistemas (WALLNER *et al.*, 1983; EL-MAGHRABY *et al.*, 1988).

Avaliações das possíveis interações entre patógenos e parasitóides sobre determinadas pragas são relatadas e de extrema importância para a escolha das técnicas a serem utilizadas e para o planejamento da execução do plano de manejo (HABIB & GARCIA, 1981; PRESS *et al.*, 1982; SNEH *et al.*, 1983; BROWER & PRESS, 1990; NEALIS *et al.*, 1992; IDRIS & GRAFIUS, 1993; MARQUES & ALVES, 1995).

Existem evidências apontando tanto para a influência negativa de alguns entomopatógenos sobre populações de insetos parasitóides e predadores quanto para efeitos de sinergismo entre os dois agentes de mortalidade. No entanto, mesmo nos casos onde a ação é negativa, esta é muito menor que a exercida pelos agrotóxicos (JAQUES & MORRIS, 1981). Dado este fato, o sistema convencional de produção e armazenamento agrícolas vêm buscando explorar o potencial de controle destes agentes como uma forma de minimizar os impactos negativos que causam. A produção em larga escala de espécies de parasitóides e predadores, assim como de produtos à base de entomopatógenos, vem se tornando cada vez mais freqüente. Porém, deve-se ressaltar que o uso do controle biológico, dentro do contexto do sistema convencional, não passa de mera substituição do insumo químico pelo biológico, não contribuindo realmente para a sustentabilidade do sistema manejado.

As interações entre entomopatógenos e parasitóides ocorrem durante o desenvolvimento larval deste último em seu hospedeiro infectado ou quando um hospedeiro parasitado é infectado pelo patógeno (BROOKS, 1993 *apud* MAGALHÃES *et al.*, 1998). O modo como ocorrem estas interações depende, em primeira instância, dos mecanismos de

interação parasitóide-hospedeiro e hospedeiro-patógeno. As interações parasitóide-patógenos podem implicar em danos ao hospedeiro ou ao parasitóide. Segundo MAGALHÃES *et al.* (1998), “as interações prejudiciais ao parasitóide podem ser decorrentes de infecção direta, toxinas, morte antecipada do hospedeiro, redução na população do hospedeiro e alterações fisiológicas e nutricionais do hospedeiro. Já as interações prejudiciais ao hospedeiro estão relacionadas com um aumento da susceptibilidade do mesmo a infecções, transmissão de patógenos pelo parasitóide, dificuldades na discriminação entre hospedeiro parasitado e não parasitado, atraso no ciclo biológico do hospedeiro e supressão do hospedeiro”.

No caso específico de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, sabe-se que este patógeno não afeta os parasitóides diretamente causando mortalidade, pois as toxinas que produz necessitam ligar-se a receptores específicos não encontrados nos parasitóides (MONERRAT, 1995 *apud* MAGALHÃES *et al.*, 1998). Assim, o seu impacto pode ser indireto, pela morte prematura dos hospedeiros (NAVON, 1993).

A exposição ao Bt geralmente não é constante, pois é muito difícil a obtenção de uma aplicação homogênea em toda a superfície do material tratado. Sendo assim, a exposição das pragas a níveis subletais de Bt ocorre com frequência. Em casos, como o da praga de florestas, *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) doses subletais de Bt aumentam a taxa de parasitoidismo por *Rogas lymantriae* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), pois as larvas permanecem por mais tempo nos estádios preferenciais do parasitóide, ficando mais vulneráveis. Entretanto, observou-se que estas dosagens subletais afetam a razão sexual do parasitóide, diminuindo o número de fêmeas na população e conseqüentemente comprometendo sua atuação no controle contínuo da praga (WALLNER *et al.*, 1983). Segundo TEMERAK (1980), apesar de dosagens de Bt facilitarem a rápida imobilização de larvas de *Sesamia cretica* (Lederer, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) pelo parasitóide *Bracon brevicornis* Wesmala (Hymenoptera: Braconidae), causam efeitos negativos sobre a progênie deste.

SALAMA & SHARABY (1988) avaliaram os efeitos na sobrevivência e desenvolvimento de *Agrotis ypsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) submetida à exposição de *B. thuringiensis* var. *galleriae* HD-234 por diferentes períodos de tempo e diferentes concentrações subletais. Puderam observar que tanto o aumento no tempo de

exposição quanto o aumento da concentração do patógeno provocaram o retardo no desenvolvimento larval e pupal, assim como diminuição na porcentagem de pupas, aumento de deformidades e menor peso neste mesmo estágio. Também evidenciaram diminuição na emergência de adultos e impactos negativos na reprodução e longevidade do lepidóptero. Concluíram que estes efeitos indiretos podem ser tão significativos para o controle desta praga quanto a mortalidade direta.

Segundo NAVON (1993) as interações sinérgicas entre Bt e parasitóides braconídeos “*refletem um aspecto comum do controle por Bt, onde somente uma parte da população é controlada por Bt e as larvas sobreviventes são expostas ao parasitoidismo*”. Porém, uma série de fatores como concentração do patógeno, tempo de infecção com o patógeno antes da exposição ao parasitoidismo, mecanismos para identificação das larvas doentes, impacto do patógeno no desenvolvimento tanto da praga alvo quanto de seus inimigos naturais, entre outros, devem ser avaliados minuciosamente e criteriosamente.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

AFIFY, A. M. et al. Histopathological effects of Biotrol BTB process 183, on third instar larvae of *Anagasta kühniella* Zeller. **Z. ang. Ent.**, v.65, n. 1, p. 38-48, 1970.

ALMEIDA, A. A. Natureza dos danos causados por insetos em grãos armazenados. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE INSETOS, Campinas, 1989. **Anais...** Piracicaba: Fundação Cargill, 1989. p.1-32.

ALTIERI, M. A. **Agroecology**. The scientific basis of alternative agriculture. 2.ed. Boulder, CO: Westview Press, 1987. 162 p.

AMARAL FILHO, B. F. **Estudos biológicos e patológicos de dois piralídeos pragas de produtos armazenados**. 1986. 167 f. Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.

---

<sup>1</sup> Conforme NBR-6023/2002.

\_\_\_\_\_.; HABIB, M.E. M. Biologia de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Agric.**, v. 65, n. 2, p. 133-141, 1990.

ASTOLFI, E.; LANDONI, J. H.; ALMEIDA, E. **Curso por correspondência sobre toxicologia de defensivos agrícolas**. São Paulo: ANDEF, 1977. 86 p.

BACH, P. **Control Biologico de las plagas de insetos y malas hierbas**. México, D.F: Continental, 1981. 949 p.

BAUER, L. S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Fla. Entom.**, v. 78, n. 3, p. 414-443, 1995.

BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai classification bichimique et sorologique de 24 sources de bacillus du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v. 7, n. 1, p. 5-31, 1962.

BEARD, R. L. Effectiveness of paralysing venom and its relation to host discrimination by braconidae wasps. **Ann. entom. Soc. Am.**, v. 65, n. 1, p. 90-93, 1972.

BENSON, J. F. Intraspecific competition in the population dynamics of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). **J. Anim. Ecol.**, v. 42, n.1, p. 105-124, 1973.

\_\_\_\_\_. Population dynamics of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) and *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Phycitidae) in a laboratory ecosystem. **J. Anim. Ecol.**, v. 43, n 1, p. 71-86, 1974.

BERNSTEIN, I. L. et al. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, n. 7, p.575-582, 1999.

BITRAN, E. A. 1989. Controle químico de pragas de grãos. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE INSETOS, Campinas, 1989. **Anais...** Piracicaba: Fund. Cargill, 1989. p. 2-15.

BROOKS, W. M. Host-parasitoid-pathogen interactions. In: BECKAGE, S.; THOMPSON, N.; FEDERICI, B. A. (eds.). **Parasites and pathogens of insects**. v. 2, 1993. New York: Academic Press. p. 231-272.



BROWER, J. H.; PRESS, J. W. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in suppressing stored-product moth populations in small inshell peanut storages. **J. Econ. Ent.**, v. 83, n. 3, p. 1096-1101, 1990.

CAJUEIRO, I. V. M. **Ecossistema de Armazenamento**. Jaguariúna: CNPMA - EMBRAPA, 1990. 18 p.

CALDERON, M. The ecosystem approach for apprehending the extent of postharvest grain losses. **Phytoparasitica**, v. 9, n. 2, p. 157-167, 1981.

CECÍLIO, A. T. B. **Bioecologia de *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae), ectoparasitóide de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) sob diferentes fotoperíodos, tipos de alimento, idade e densidade de hospedeiro**. 1993. 91f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

CELARO, J. C. Métodos curativos de controle de pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (eds.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. p. 493-529.

CHILCUTT, C. F.; TABASHNIK, B. E. Independent and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera; Braconidae) on susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera; Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n. 2, p. 397-403, 1997.

CLAUSEN, C.P. **Entomophagous insects**. New York: Hafuer Publishing Co, 1962. 688 p.

CLINE, L. D.; PRESS, J. W.; FLAHERTY, B. R. Preventing the spread of the almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) from infested food debris to adjacent uninfested packages, using the parasite *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). **J. Econ. Ent.**, v. 77, n. 2, p. 331-333, 1984.

CONFERÊNCIA DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. **AGENDA 21**. Rio de Janeiro, 1992. 217 p.

COX, P. D. Cold tolerance and factors affecting the duration of diapause on the tolerance of larvae of *Ephestia kühniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 23, n. 3, p. 163-168, 1987.

\_\_\_\_\_ et al. The incidence of diapause in seventeen populations of the flour moth *Ephestia kühniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 20, n. 3, p. 139-143, 1984.

DENT, D. **Insect Pest Management**. 2 ed. New York: CABI Publishing, 2000. 410 p.

DRUMMOND, J.; PINNOCK, D. E. Host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecosystems Environ.**, v.49, n. 1, p. 15-19, 1994.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H. D. (ed.). **Microbial control of pests and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. p. 129-141.

\_\_\_\_\_; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: KURSTAK, E. (ed.). **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 209-238.

DUNKEL, F. V. The stored grain ecosystem: a global perspective. **J. Stored Prod. Res.**, v. 28, n. 2, p. 73-87, 1992.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável: Origens e perspectivas de um novo paradigma**. 2.ed. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1999. 157 p.

EL-MAGHRABY, M. M. A.; HEGAB, A.; YOUSIF-KHALIL, S. I. Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berl., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the host/ parasitoid system *Spodoptera littoralis* (Boisd.)/ *Microplitis rufiventris* Kok. **J. Appl. Ent.**, v. 106, n.4, p. 417-421, 1988.

FARONI, L. R. D. et al. Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. **Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.**, v.6, n.2, p. 354-357, 2002.

FERRAZ, J.M.G. A insustentabilidade da revolução verde. **Informativo EMBRAPA Meio Ambiente**, v. 26, n. 2, p. 3, 1999.

FIELDS, P. G. The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures. **J. Stored Prod. Res.**, v. 28, n. 2, p. 89-118, 1992.

FLINN, P. W. Temperature effects on efficacy of *Choetospila elegans* (Hymenoptera: Pteromalidae) to suppress *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. **J. Econ. Ent.**, v. 91, n. 1, p. 320-323, 1998.

\_\_\_\_\_; HAGSTRUM, D. W. Augmentative releases of parasitoid wasps in stored wheat reduces insect fragments in flour. **J. Stored Prod. Res.**, v. 37, n. 1, p. 179-186, 2001.

FOWLER, C.; MOONEY, P. R. **Shattering: food, politics, and the loss of genetic diversity**. Tucson: University of Arizona Press, 1990. 276 p.

GALLO, D. et al. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2. ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GARCIA, M. A. Introdução. In: I WORKSHOP SOBRE AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, Campinas, 1999. **Resumos...**Campinas: Instituto de Biologia - Depto de Zoologia, 1999. p. 1.

GLIESSMAN, S. R. 2000. **Agroecologia**: processos ecológicos em agricultura sustentável. 1. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000. 653 p.

GUEDES, R. N. C. Importância e limitações no armazenamento e conservação de grãos. **Rev. Bras. Armaz.**, v.15, n. 1, p. 1-3, 1991.

HABIB, M. E. M. **Histopathological studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* Zeller**. 1968. 178 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Agronomia, Universidade de Alexandria, Alexandria, Egito, 1968.

\_\_\_\_\_. **Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* para larvas de Lepidoptera e Diptera**. 1982. 132 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

\_\_\_\_\_; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

\_\_\_\_\_; GARCIA, M. A. Compatibility and synergism between *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and two chemical insecticides. **Z. ang. Entomol.**, v. 91, n. 1, p. 7-14, 1981.

\_\_\_\_\_. et al. Patogenicidade de dois formulados à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b) em larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.:Pyralidae). **Bioikos**, v. 5, n. 2, p. 31-66, 1991.

HANSEN, L. S.; JENSEN, K. M. Effect of temperature on parasitism and host-feeding of *Trichogramma turkestanica* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) **J. Econ. Entomol.**, v. 95, n. 1, p 50-56, 2002.

HEISER JR, C. B. 1977. **Sementes para a civilização**: a história da alimentação humana. 1.ed. São Paulo: Biblioteca do Espírito Moderno, 1977. 253 p.

HOLLOWAY, J. D.; BRADLEY, J. D.; CARTER, D. J. **IIE Guides to Insects of Importance to Man**: 1. Lepidoptera. London: International Institute of Entomology, 1992. 262 p.

HOWE, R. W. A summary of estimates of optimal conditions for population increase of some stored products insects. **J. Stored Prod. Res.**, v.1, n. 2, p. 177-184, 1965.

IDRIS, A. B.; GRAFIUS, E. Pesticides affect immature stages on *Diadema insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its host, the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 86, n. 4, p. 1203-1212, 1993.

JAKES, R. P.; MORRIS, O. N. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. In: BURGESS, H. D. (ed.). **Microbial control of pests and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. 949 p.

JENKINS, R. El polémico *Bacillus thuringiensis*. **Biodiversidad, Sustento y Culturas**: on line. Disponível em: <<http://www.grain.org/publications/spanish/biodiv194.htm>>. Acesso em: 6 julho 2000.

JOHNSON, J. A.; WOFFORD, P. L.; GILL, R. F. Developmental thresholds and degree-day accumulations of indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts. **J. Econ. Entomol.**, v. 88, n. 3, p. 735-740, 1995.

LEESCH, J. G. Fumigant action of acrolein on stored-product insect. **J. Econ. Entomol.**, v. 88, n. 2, p. 326-330, 1995.

LONGSTAFF, B. C. The management of stored product pests by non-chemical means: an australian perspective. **J. Stored Prod. Res.**, v. 30, n. 3, p. 179-185, 1997.

LORINI, I. Aplicação do manejo integrado de pragas em grão armazenados. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, Passo Fundo, 1993. **Anais...**Passo Fundo: EMBRAPA - CNPT, 1993. 147 p.

\_\_\_\_\_. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: EMBRAPA - CNPT, 1998. 52 p.

\_\_\_\_\_. Pragas: no armazém, proteja os grãos. **Comunicado Técnico**: on-line, n. 21, 1999. Disponível em: < [www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co21.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co21.htm) >. Acesso em: 11 abril 2004.

\_\_\_\_\_. Manejo integrado de pragas de grãos armazenados (MIPGrãos). In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (eds.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. p. 607-621

MAGALHÃES, B. P.; MONERRAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. FEALQ: Piracicaba, 1998. p. 195-216.

MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P. Biologia do ectoparasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) em sete espécies de lepidópteros. **Sci. Agric.**, v. 58, n. 4, p. 693-698, 2001.

MALUF, R. S. Segurança alimentar, desenvolvimento sustentável e planejamento agroalimentar. **Agric. Sust.**, v. 2, n. 2, p. 34-44, 1995.

- MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**: com uma introdução sobre o estudo dos insetos. São Paulo: Livraria Nobel, 1983. 305 p.
- MARQUES, I. M. R.; ALVES, S. B. Influence of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* on *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyer) (Lepidoptera: Gelechiidae) parasitism for *Trichogramma pretiosum* R. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 38, n. 1, p. 317-325, 1995.
- MATSON, P. A. et al. Agricultural intensification and ecosystems properties. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 504-509, 1997.
- McGAUGHEY, W. M. H. Moth control in stored grain: efficacy of *Bacillus thuringiensis* on corn and methods of evaluation using small bins. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 5, p. 835-839, 1978a.
- \_\_\_\_\_. Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 6, p. 923-925, 1978b.
- \_\_\_\_\_. Methods of applying *Bacillus thuringiensis* to stored corn for moth control. **J. Econ. Entomol.**, v. 73, n. 2, p. 228-229, 1980a.
- \_\_\_\_\_. *Bacillus thuringiensis* for moth control in stored wheat. **Can. Ent.**, v. 112, n. 3, p. 327-331, 1980b.
- \_\_\_\_\_. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, n. 4709, p. 93-195, 1985.
- \_\_\_\_\_. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecosystems Environ.**, v. 49, n. 1, p. 95-102, 1994.
- MENON, A.; FLINN, P. W.; DOVER, B. A. Influence of temperature on the functional response of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 38, n. 3, p. 463-469, 2002.

- METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley & Sons, 1982. 577 p.
- MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecosystems. Environ.**, v. 49, n. 1, p. 9-13, 1994.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Brometo de metila. **ProControl**: on-line disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sqa/ozonio/historico/brometo.html>>. Acesso em: 10 setembro 2004.
- MONERRAT, R.G. **Interrelations entre la teigne des crucifères *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), son parasitoïde *Diadegma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) et la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 1995. 162 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, 1995.
- MOONEY, P. R. **O escândalo das sementes: o domínio da produção de alimentos**. São Paulo: Ed. Nobel, 1987. 146 p.
- MULTON, J. L. **Preservation and storage of grains, seeds and their by products**. New York: Lavoisier Publishing, 1988. 1095 p.
- MUNRO, J.W. **Pests of stored products**. London: Hutchinson & Co., 1966. 234 p.
- NAKANO, O. et al. **Manual de Inseticidas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1977. 272 p.
- NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (eds.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p.124- 146.
- NEALIS, V. G.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; CADOGAN, B. L. Conservation of spruce budworm parasitoids following application of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. **Can. Ent.**, v. 124, n. 6, p. 1085-1092, 1992.

NIELSEN, P. S. Predation by *Blattisocius tarsalis* (Berlese) (Acari: Ascidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Stored Prod. Res.**, v 39, n. 3, p. 395–400, 2003.

ODUM, E. P. Properties of agroecosystems. In: LOWRANCE, R.; STINNER, B. R.; HOUSE, G. J. (eds.). **Agricultural ecosystems unifying concepts**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p. 5-11.

PASCHOAL, A. D. **Produção orgânica de alimentos**. Agricultura sustentável para os séculos XX e XXI. Piracicaba: USP - ESALQ, 1994. 279 p.

PARKIN, E. A. The onset of insecticide resistance among field populations of stored-product insects. **J. Stored Prod. Res.**, v. 1, n. 1, p. 3 -8, 1965.

PEDERSEN, J.R.; MILLS, R.B. The role of pesticides in preservation of stored grain and grain products. In: WHITE, S. (ed.). **Pesticides in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1977. p. 257-312.

PEREZ-MENDOZA, J. et al. Effects of protect-it on efficacy of *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitizing rice weevils (Coleoptera: Curculionidae) in wheat. **Environ. Entomol.**, v. 28, n. 3, p. 529-534, 1999.

PHILLIPS, T. Biological control of stored-product pests. **Midwest Biological Control news**: on line. Disponível em: <<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/fea210.html>>. Acesso: 15 setembro 2004.

PUZZI, D. **Conservação de Grãos Armazenados**. 1. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1973. 219 p.

\_\_\_\_\_. **Manual de Armazenamento de Grãos**: armazéns e silos. 1. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1977. 405 p.

\_\_\_\_\_. **Abastecimento e Armazenagem de Grãos**. 1. ed. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 232 p.



PRESS, J. W.; CLINE, L. D.; FLAHERTY, B. R. A comparison of two parasitoids, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and a predator, *Xylocoris flavipes* (Hemiptera: Anthocoridae) in suppressing residual populations of the almond moth, *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Kans. Entomol. Soc.**, v. 55, 8, p. 725-728, 1982.

REICHMUTH, C. Stored product protection with alternative methods. In: INTERNATIONAL FORUM ON STORED PRODUCT PROTECTION AND POST-HARVEST TREATMENT OF PLANT PRODUCTS, 1996, Strasbourg. **Proceedings...**Strasbourg: Council of Europe, 1996. p. 129-135.

RICHARDS, O. W.; THOMSON, W. S. A contribution to the study of genera *Ephestia*, Gn (including *Strymax*, Dyar), and *Plodia*, Gn (Lepidoptera, Phycitidae), with notes on parasites of the larvae. **Trans. Ent. Soc. Lo.**, v. 80, n. 2, p. 169-250, 1932.

ROMEIRO, A. R.; SALLES FILHO, S. Dinâmica das inovações sobre restrição ambiental. In: ROMEIRO, A. R.; REYDON, B. P.; LEONARDI, M. L. A. (eds.). **Economia do meio ambiente**: teoria, políticas e gestão de espaços regionais. Campinas: UNICAMP - IE, 1996. p. 83- 122.

ROSSET, P. M. La crisis de la agricultura convencional, la sustitución de insumos y el enfoque agroecológico. **Agroec. Des.**, v. 11-12, n. 1, 159kb, 1997. Disponível em: <<http://www.clades.cl/revistas/1112/rev11art1.htm>>. Acesso em: 20 janeiro 1999.

SALAMA, H. S.; SHARABY, A. F. Effects of exposure to sublethal levels of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) on the development of the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Hufn.). **J. Appl. Ent.**, n. 106, v. 3, p. 396-401, 1988.

SANTOS, J. A. Recomendações para o controle de pragas de grãos e sementes armazenadas. In: BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. (eds.). **Cultura do Milho. Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 197-236.

\_\_\_\_\_. Colheita e pós-colheita. **Sistema da Produção**, n. 2, 2000. Disponível: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/colheita.htm>>. Acesso em: 11 abril 2004.

SARTORI, M.R. Resistência de pragas de grãos. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, Passo Fundo, 1993. **Anais...**Passo Fundo: EMBRAPA - CNPT, 1993. p. 28-43.

\_\_\_\_\_. Resistência de insetos-praga de grãos a pesticidas. **Vetores & Pragas**, v. 1, n. 3, p. 4-6, 1996.

\_\_\_\_\_; LORINI, I. Levantamento e manejo de resistência de insetos de grãos armazenados no Brasil. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (eds.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. p. 569-594.

\_\_\_\_\_; PACHECO, I. A.; VILAR, R. M. G. Resistance to phosphine in stored grain insects in Brazil. In: 5<sup>TH</sup> INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, Bordeaux, France, 1990. **Proceedings...** Bordeaux, v. 2, 1990. p. 1041-1050.

SCHÖLLER, M. et al. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **J. Stored Prod. Res.**, v. 33, n. 1, p. 81-97, 1997.

\_\_\_\_\_; HASSAN, S. A. Comparative biology and life tables of *Trichogramma evanescens* and *T. cacoeciae* with *Ephestia elutella* as host at four constant temperatures. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 98, n. 1, p. 35-40, 2001.

SERRA, H. J. P. **Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879 ) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 1992. 91 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of Bacillus thuringiensis-based insecticides. **J. Inv. Pathol.**, v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

SILVA, J.G. **A nova dinâmica da agricultura brasileira**. Campinas: UNICAMP - IE, 1996. 217 p.

SILVEIRA NETO, S. et al. **Manual de Ecologia dos Insetos**. 1. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1976. 419 p.

SINHA, R. N. The stored grain ecosystem. In: JAYAS, D.S.; WHITE, N. D. G.; MUIR, W. E. (eds.). **Stored-grain ecosystems**. New York: Marcel Dekker, 1995. p 1-32.

SNEH, B.; GROSS, S.; GASITH, A. Biological control of *Spodoptera littoralis* (Boisod) (Lepidoptera : Noctuidae) by *Bacillus thuringiensis* subs *entomocidus* and *Bracon hebetor* (Hymenoptera : Braconidae). **Z. ang. Entom.**, v. 96, n. 4, p. 408-412, 1983.

STEIDLE, J. L. M.; SCHÖLLER, M. Fecundity and ability of the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) to find larvae of the granary weevil *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae) in bulk grain. **J. Stored Prod. Res.**, v. 38, n.1, p. 43–53, 2002.

TABASHNICK, B. E. et al. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 83, n. 6, p. 1671-1676, 1990.

\_\_\_\_\_.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 85, n. 6, p.1046-1055, 1991.

TAMASHIRO, M. The susceptibility of *Bracon*-paralyzed *Corcyra cephalonica* (Stainton) to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. **J. Insect Patol.**, v. 2, n. 2 ,p. 209-219, 1960.

TAYLOR, R. W. D. Methyl bromide: is there any future for this noteworthy fumigant ? **Stored Prod. Res.**, v. 30, n. 4, p. 243–260, 1994.

TEMERAK, S. A. Detrimental effects of rearing a braconid parasitoid on the pink borer larvae inoculated by different concentrations of bacterium, *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Z. ang. Entom.**, v. 89, n. 3, p. 315-318, 1980.

THOMPSON, R. H. A review of the properties and usage of methil bromide as a fumigant. **J. Stored Prod. Res.**, v. 1, n. 4, p. 353-376, 1966.

WAIB, C.M. **Potencialidade de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* no controle de coleópteros prejudiciais**. 1992. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

WALLNER, W. E.; DUBOIS, N. R.; GRINBERG, P. S. Alteration of parasitism by *Rogas lymantriae* (Hymenoptera: Braconidae) in *Bacillus thuringiensis*-stressed gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) hosts. **J. Econ. Entomol.**, v. 76, n. 2, p. 275-277, 1983.

WATKINSON, I. Global view of present and future markets for Bt products. **Agric. Ecosystems Environ.**, v. 49, n. 1, p. 3-7, 1994.

WEBER, E. **Armazenagem Agrícola**. Porto Alegre: Kepler Weber Industrial, 1995. 400 p.

## OBJETIVOS GERAIS

Considerando-se a viabilidade da utilização de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) e *Bracon hebetor* em ecossistemas de armazenagem para controle de lepidópteros pragas, como *Ephestia kuehniella*, este trabalho teve como objetivos avaliar o impacto e as interações dos dois agentes de mortalidade sobre este piralídeo. Sendo assim, buscou-se:

1. avaliar a susceptibilidade de larvas de *E. kuehniella* a um produto comercial à base de Btk;
2. avaliar a influência do sexo das larvas de quinto estágio sobre a susceptibilidade de *E. kuehniella* ao produto à base de Btk;
3. analisar os efeitos crônicos decorrentes de tratamentos com o produto à base de Btk no desenvolvimento dos piralídeos sobreviventes à exposição;
4. avaliar o impacto da patogenia causada pelo produto à base de Btk nas larvas de *E. kuehniella* sobre o desenvolvimento do seu ectoparasitóide, *B. hebetor*;
5. analisar as possíveis interações de compatibilidade, antagonismo ou sinergismo entre o parasitóide e o produto entomopatogênico;
6. avaliar a capacidade de *B. hebetor* selecionar hospedeiros entre larvas de *E. kuehniella* sadias e infectadas por Btk.



## MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

O presente trabalho foi realizado com populações de *Ephesia kuehniella* e *Bracon hebetor* já estabelecidas e adaptadas a condições de laboratório. As criações estoque foram mantidas no Laboratório de Entomologia Aplicada, do Departamento de Zoologia, UNICAMP.

As condições adotadas tanto para a manutenção das criações quanto para os bioensaios efetuados foram  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa (UR) e 12 horas de fotofase.

Para a criação matriz de *E. kuehniella* utilizaram-se potes de plástico transparente (17 x 6,5 cm, volume 1.000 ml), cujas tampas possuíam uma abertura central, coberta por organza, para garantir a aeração adequada no recipiente. Cada pote recebeu cerca de 160g da dieta básica, composta por farinha de trigo integral, gérmen e farelo de trigo (8:1:1), onde, posteriormente, foram distribuídos os ovos do lepidóptero (150 a 200 ovos/ frasco). Todos os potes foram rotulados com número de série e data de oviposição para acompanhamento do desenvolvimento do inseto (Figura 10).

Adultos obtidos na criação foram coletados diariamente, por sucção, e transferidos para frascos de vidro (7,5 x 18,0 cm) fechados com malha sintética e elástico, onde ocorreu o acasalamento e a oviposição. Tais frascos foram colocados com a abertura para baixo em um suporte cônico de plástico sobre uma placa de Petri (Figura 11). Os ovos que caíam na superfície da placa foram recolhidos diariamente e lavados em uma solução de hipoclorito (10%). Posteriormente, foram observados em microscópio estereoscópico para garantir a ausência de contaminação da criação por ácaros predadores de ovos.



**Figura 10.** Pote para criação geral de *Ephestia kuehniella* em laboratório.



**Figura 11.** Frasco para acasalamento e obtenção de ovos de *Ephestia kuehniella*.



Placas de Petri (3,0 x 7,0 cm) foram utilizadas para a manutenção da criação matriz de *Bracon hebetor*. Foram separadas 20 placas contendo 10 larvas de último estágio do piralídeo quinzenalmente. Em cada placa introduziram-se 2 casais do braconídeo e estes permaneceram na presença do seu hospedeiro durante 48 horas para efetuar o parasitoidismo. Posteriormente, os casais foram retirados e as placas numeradas, separadas e observadas até a emergência dos adultos.

O produto comercial à base do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* utilizado nos bioensaios foi o Dipel PM<sup>®</sup> (Sumitomo Chemical do Brasil Ltda), linhagem HD-1, formulação em pó molhável. Este contém o complexo esporo - cristal desta bactéria, 16.000 unidades internacionais (UI) de potência por miligrama e mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama.



# **Capítulo 1: SUSCEPTIBILIDADE DE *Ephestia kuehniella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) A UM PRODUTO COMERCIAL À BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.**

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de larvas de diferentes estádios de *Ephestia kuehniella* (primeiro, terceiro e último) a um produto comercial à base de Btk (Dipel PM<sup>®</sup>). Além disso, analisou-se a influência do sexo larval na susceptibilidade de larvas de quinto estágio do pirálídeo ao inseticida microbiano. Observou-se que a mortalidade larval variou diretamente em função da concentração de produto utilizada, porém a susceptibilidade apresentou uma relação inversa com a idade larval. Assim, larvas de primeiro estágio apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com Dipel PM<sup>®</sup> (CL<sub>50</sub> = 0,05%; I.C. = 0,04% – 0,06%). As de terceiro apresentaram uma susceptibilidade intermediária (CL<sub>50</sub> = 0,16%; I.C. = 0,12% – 0,20%), enquanto as no último estágio demonstraram o menor nível de susceptibilidade (CL<sub>50</sub> = 1,77%; I.C. = 1,42% - 2,23%). Foi comprovado que o sexo larval no quinto estágio não interfere na susceptibilidade ao produto à base de Btk, visto que machos e fêmeas de *E. kuehniella* não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de mortalidade (F= 46,038;  $P < 0,05$ ) quando tratadas com Dipel PM<sup>®</sup> na concentração de 1,77% em farinha de trigo integral.

## 1.1. INTRODUÇÃO

Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), linhagem HD-1, foram comercialmente introduzidos na década de 70 por apresentarem um espectro de atividade maior que as demais linhagens. A atividade patogênica destes produtos foi constatada em mais de 100 espécies de lepidópteros (NAVON, 1993), incluindo espécies pragas de produtos em sistemas de armazenagem (McGAUGHEY, 1978 a, b; McGAUGHEY & DICKE, 1980). Todavia, a susceptibilidade varia em função de uma série de fatores, como estágio de desenvolvimento, hábito alimentar, ciclo de vida, comportamento, contato prévio com o patógeno e variabilidade genética (YAMVRIAS, 1962; HABIB, 1968; McGAUGHEY & JOHNSON, 1987; AMARAL FILHO & HABIB, 1993; NAVON, 1993; ALI *et al.*, 2004).

AFIFY & MATTER (1969) observaram menor taxa de emergência de fêmeas em relação à obtida para machos em seu trabalho sobre efeitos crônicos de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner sobre *Ephestia kuehniella*. Assim sendo, os autores também sugerem que estudos para avaliar a susceptibilidade em função do sexo da praga alvo de controle devem ser realizados visto que se confirmada, tal relação poderia afetar a razão sexual da população sobrevivente e, em consequência, sua dinâmica populacional.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram analisar a susceptibilidade de *E. kuehniella* a um produto comercial à base de Btk (Dipel PM<sup>®</sup>) em função da idade e do sexo larval.

## 1.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1. Susceptibilidade de diferentes estádios de *Ephestia kuehniella* a produto à base de Btk.

A avaliação da susceptibilidade de diferentes estádios larvais de *E. kuehniella* a Btk, oriundo do produto comercial Dipel PM®, foi realizada através do estabelecimento e análise dos valores de três concentrações para larvas do primeiro (L1), terceiro (L3) e quinto (L5) estádios. Foram calculadas a CL<sub>30</sub> (causadora de 30% de mortalidade nas amostras da população), a CL<sub>50</sub> (concentração letal mediana) e a CL<sub>70</sub>, (responsável por 70% de mortalidade).

Inicialmente, realizou-se uma avaliação preliminar da susceptibilidade de larvas de cada um dos três estádios avaliados. Estabeleceram-se concentrações separadas por um fator de progressão geométrica ( $q$ ) para assim se estipular a faixa de concentrações a serem utilizadas nos bioensaios definitivos (HADDAD, 1986) (Equação 1).

**Equação 1.** Cálculo para estabelecer o fator de progressão geométrica.

$$q = \sqrt[n-1]{a_n / a_1}$$

onde:

$q$  = fator de progressão geométrica;

$n$  = número de tratamentos a serem utilizados no bioensaio;

$a_n$  = concentração responsável pelo maior nível de mortalidade;

$a_1$  = concentração responsável pelo menor nível de mortalidade.

A partir dos dados obtidos nesta avaliação inicial foi encontrado o menor intervalo que abrangesse mortalidades entre  $\pm 10\%$  e  $\pm 95\%$ . O valor de  $q$  foi então recalculado para aumentar o número de tratamentos dentro deste intervalo. A partir de um novo bioensaio foi avaliado o efeito de diferentes concentrações nas larvas do piralídeo e os cálculos referentes a CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>70</sub> foram realizados.

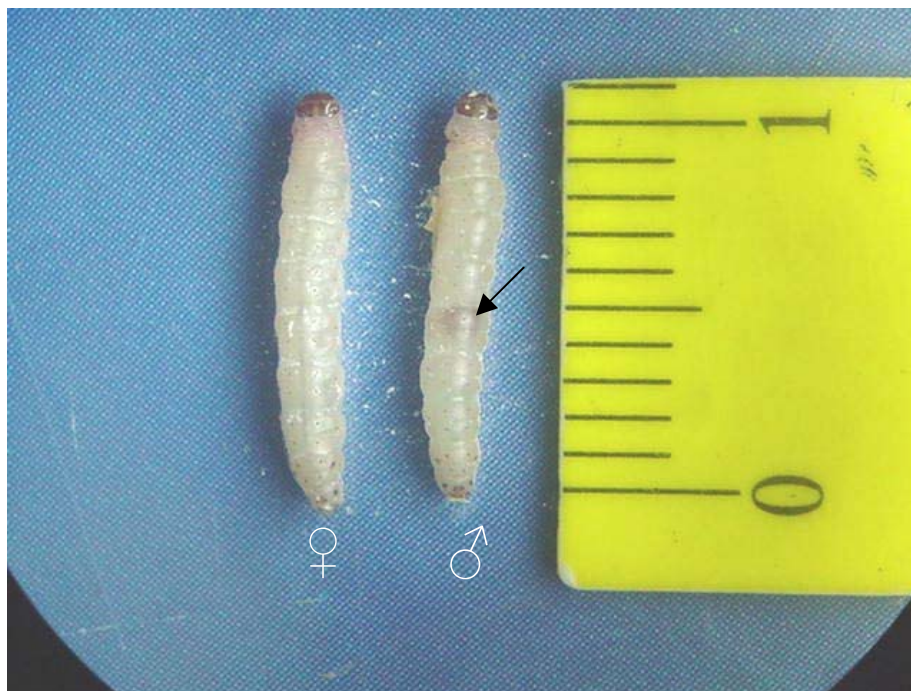
Os bioensaios para avaliar a susceptibilidade de L1 (25 indivíduos/ repetição; 4 repetições por concentração) de *E. kuehniella* ao inseticida microbiano foram conduzidos com as seguintes concentrações de Dipel PM® em de farinha de trigo integral: 0,02%, 0,03%, 0,06%, 0,1% e 0,17%. Já os bioensaios com L3 (25 indivíduos/ repetição; 3 repetições por concentração) foram realizados com as concentrações de 0,04%, 0,10%, 0,23%, 0,55% e 1,28%. E, finalmente, as concentrações utilizadas na avaliação da susceptibilidade de larvas de último estágio (L5) (25 indivíduos/ repetição; 4 repetições por concentração) foram: 0,23%, 0,55%, 1,28%, 3% e 7,02%. Em todos os casos foram estabelecidos grupos testemunha, os quais foram alimentados apenas com farinha de trigo integral.

As larvas foram expostas ao consumo de farinha de trigo integral tratada com o produto à base de Btk, em placas de Petri, por 90 horas. Estas foram mantidas em sala climatizada ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  U.R. e 12h de fotofase). Após este período a mortalidade de cada estágio foi registrada e, posteriormente, foi corrigida pela equação de ABBOTT (1925) quando o grupo testemunha apresentou mortalidade superior a 5%. Os dados obtidos foram avaliados no programa SYSTAT (versão 5.0) (SYSTAT, Inc) e as  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{70}$  calculadas pelo programa EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM (versão 1.5) e pela aplicação da fórmula de THOMPSON (1947), adaptada por HABIB (1982 e 1986).

### **1.2.2. Influência do sexo na susceptibilidade de larvas de quinto estágio de *E. kuehniella* a um produto à base de Btk.**

Para avaliar a relação entre o sexo e a susceptibilidade de larvas de quinto estágio de *E. kuehniella* ao produto comercial à base de Btk foram separados grupos de larvas de diferentes sexos (25 larvas/repetição; 8 repetições/ tratamento), os quais foram diferenciados devido à presença de uma mancha avermelhada, correspondente às gônadas masculinas em formação nos machos (Figura 12). As larvas foram colocadas em placas de Petri contendo o inseticida microbiano em farinha de trigo integral, na concentração equivalente à  $CL_{50/90h}$  para o quinto estágio (1,77%). O grupo testemunha de cada sexo (25 larvas/repetição; 8 repetições/ tratamento) foi tratado com farinha de trigo integral. Os bioensaios foram mantidos em sala climatizada, nas condições anteriormente descritas. A mortalidade nos tratamentos foi avaliada 90 horas após o início das exposições. Os dados

foram coletados e analisados através de ANOVA, no programa SYSTAT (versão 5.0) (SYSTAT, Inc)



**Figura 12.** Larvas de quinto estágio de *Ephestia kuehniella* do sexo feminino (esquerda) e masculino (direita) (seta aponta as gônadas masculinas em formação, visíveis nos machos).

### 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1.3.1. Susceptibilidade de diferentes estádios de *E. kuehniella* a produto à base de Btk.

A mortalidade no primeiro estágio larval (L1) de *E. kuehniella* variou em função da concentração do inseticida microbiano na dieta, sendo que as maiores concentrações foram responsáveis pelos maiores níveis de mortalidade. Diferenças significativas foram observadas entre as concentrações avaliadas ( $F= 81,17$ ;  $P< 0,05$ ) (Tabela 1) e todos os tratamentos ocasionaram efeitos letais significativamente superiores ao obtido no grupo não tratado com o produto à base de Btk.

**Tabela 1.** Efeito da concentração de produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de primeiro estágio de *Ephestia kuehniella*, após 90 horas.

Parâmetro	Concentração (%)					
	T*	0,02	0,03	0,06	0,11	0,17
<b>Mortalidade média (%)</b>	0,00 <i>a</i>	28,00 <i>b</i>	35,00 <i>b</i>	55,00 <i>c</i>	63,00 <i>c</i>	87,00 <i>d</i>
<b>Erro Padrão</b>	0,00	1,63	4,12	4,44	3,00	4,44

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

\* T= Testemunha

Larvas de terceiro estágio (L3) do piralídeo também apresentaram uma relação direta entre o aumento da concentração do produto contendo o entomopatógeno e o aumento da mortalidade (Tabela 2). Constatou-se que neste caso também existem diferenças significativas entre a mortalidade nas diferentes concentrações avaliadas ( $F=53,16$ ;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Efeito da concentração produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Ephestia kuehniella*, após 90 horas.

Parâmetro	Concentração (%)					
	T*	0,04	0,10	0,23	0,55	1,28
<b>Mortalidade média (%)</b>	0,00 <i>a</i>	18,67 <i>ab</i>	38,67 <i>b</i>	68,0 <i>c</i>	70,67 <i>cd</i>	90,67 <i>d</i>
<b>Erro Padrão</b>	0,00	1,33	5,81	6,12	5,81	5,33

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

\*T= Testemunha



A concentração do produto à base de Btk também se relacionou diretamente com a mortalidade obtida nas larvas de último estágio (L5) de *Ephestia kuehniella* (Tabela 3). Evidenciou-se que existem diferenças significativas entre os tratamentos ( $F= 44,37$ ;  $P< 0,05$ ). O grupo testemunha não diferiu significativamente do tratamento que empregou a menor concentração do produto (0,23%), mas apresentou diferenças significativas em relação às demais concentrações avaliadas.

**Tabela 3.** Efeito da concentração de produto microbiano à base de Btk na mortalidade de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, após 90 horas.

Parâmetro	Concentração (%)					
	T*	0,23	0,55	1,28	3,00	7,02
<b>Mortalidade média (%)</b>	0,00 <i>a</i>	13,00 <i>ab</i>	25,00 <i>b</i>	49,00 <i>c</i>	53,00 <i>c</i>	81,00 <i>d</i>
<b>Erro Padrão</b>	0,00	1,92	3,00	8,54	2,52	5,26

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

\*T= Testemunha

A susceptibilidade do piralídeo ao produto diminuiu com o avanço do seu desenvolvimento, o que é demonstrado através dos valores obtidos para as  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{70}$  (Tabela 4). Desta forma, as larvas demonstraram ser muito mais susceptíveis ao produto à base de Btk de primeiro estágio que nos demais estádios avaliados (L3 e L5), como já evidenciado por outros pesquisadores (AFIFY & MATTER, 1969; AMARAL FILHO, 1986; HABIB *et al.*, 1991).

**Tabela 4.** Valores de CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>70</sub> para larvas de primeiro, terceiro e quinto estádios de *Ephestia kuehniella*, e seus respectivos intervalos de confiança (IC), após 90 horas de tratamento com produto à base de Btk.

Idade	Concentração (%)		
	CL <sub>30</sub> (IC)	CL <sub>50</sub> (IC)	CL <sub>70</sub> (IC)
<b>Primeiro estágio</b>	0,02 (0,01 - 0,03)	0,05 (0,04 – 0,06)	0,11 (0,08 – 0,17)
<b>Terceiro estágio</b>	0,07 (0,04 – 0,10)	0,16 (0,12 – 0,20)	0,25 (0,24 – 0,26)
<b>Último estágio</b>	0,52 (0,33 – 1,24)	1,77 (1,42 – 2,23)	4,82 (2,90 – 8,03)

AFIFY *et al.* (1970) propõem duas explicações para este fenômeno. A primeira seria ao comportamento das larvas de *E. kuehniella*. Segundo os autores, a crescente habilidade em produzir estruturas na farinha, que se comparam a pequenos túneis, onde se abrigam, diminui as chances de contato com a dieta contendo o entomopatógeno. Já a segunda estaria ligada ao aumento da tolerância ao Btk devido ao crescimento larval, todavia não elucidaram o mecanismo responsável. Porém, posteriormente, HABIB & ANDRADE (1998) propuseram que esta variação no grau de susceptibilidade está condicionada à relação existente entre o número de unidades infectivas do patógeno por unidade de peso, e desta forma também estaria relacionado ao desenvolvimento do inseto.

Segundo BRYANT (1994), todos os inseticidas induzem uma resposta às doses aplicadas relacionada ao peso do inseto tratado, mas o Bt é particularmente sensível ao efeito do peso larval. Sendo assim, apesar das larvas maiores poderem ser mortas por este agente entomopatogênico, requerem doses ou concentrações substancialmente maiores que as larvas com menor peso.

As concentrações letais medianas para os três estádios avaliados neste trabalho diferiram significativamente dos obtidos por AMARAL FILHO (1986) na sua avaliação da suscetibilidade de *E. kuehniella* a Dipel PM<sup>®</sup>. Para o primeiro e terceiro estádios os valores obtidos formam inferiores aos obtidos pelo autor ( $CL_{50/90h} = 0,396\%$  e I. C. =  $0,220\% - 0,713\%$ ;  $CL_{50/90h} = 0,343\%$  e I. C. =  $0,209\% - 0,563\%$ , respectivamente), o que pode estar relacionado ao fato dos dois trabalhos terem avaliado diferentes populações do pirálídeo. Entretanto, a  $CL_{50/90h}$  obtida pelo autor para o último estádio foi inferior ( $CL_{50/90h} = 0,566\%$ ; IC =  $0,293\% - 1,000\%$ ). Provavelmente, tal fato se deva ao comportamento alimentar deste estádio, pois nesta fase de desenvolvimento as L5 tendem a diminuir progressivamente sua atividade de forrageamento até atingir a fase de pré – pupa, onde não se alimentam. Desta forma, pequenas divergências na idade podem acarretar em diferenças na susceptibilidade obtida, apesar das larvas de ambos os trabalhos estarem no mesmo estádio.

### **1.3.2. Influência do sexo na susceptibilidade de larvas de quinto estádio de *E. kuehniella* a um produto à base de Btk.**

Não se observou uma alteração na susceptibilidade das larvas de quinto estádio de *E. kuehniella* ao produto à base de Btk em função do sexo (Tabela 5). Tanto machos, quanto fêmeas, foram igualmente susceptíveis ao tratamento com o Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral na concentração de 1,77%. Houve diferença significativa entre os grupos tratados com o inseticida microbiano e o grupo testemunha ( $F = 46,038$ ;  $P < 0,05$ ). Todavia, comparando-se a mortalidade de machos e fêmeas não tratados com o produto (testemunhas) constatou-se que esta não divergiu significativamente. Desta forma, conclui-se que a susceptibilidade ao entomopatógeno é semelhante nos indivíduos de ambos os sexos neste estádio de desenvolvimento, sendo descartada a possibilidade de alterar a razão sexual da população.

**Tabela 5.** Mortalidade (em número absoluto) de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella* de diferentes sexos, submetidas a tratamento com produto à base de Btk (1,77%) por 90 horas.

<b>Sexo</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Número de indivíduos mortos (média ± E. P.)</b>
<b>Fêmeas</b>	<b>Testemunha</b>	0,00 ± 0,00 <i>a</i>
	<b>1,77</b>	15,36 ± 1,45 <i>b</i>
<b>Machos</b>	<b>Testemunha</b>	0,13 ± 0,13 <i>a</i>
	<b>1,77</b>	11,75 ± 1,83 <i>b</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

## 1.4. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos sobre a susceptibilidade de *E. kuehniella* ao produto comercial Dipel PM<sup>®</sup> concluiu-se que, do ponto de vista econômico, os programas para o manejo deste pirálídeo devem se basear no controle do primeiro estágio larval, visto que este apresenta maior susceptibilidade ao patógeno. Sendo assim, haveria menor gasto na aplicação do produto na massa armazenada. Tais programas devem adotar técnicas de monitoramento que permitam inferir de forma adequada o momento ideal para a aplicação do formulado microbiano.

Também se observou que o sexo das larvas de *E. kuehniella* no quinto estágio não é não influenciou a susceptibilidade do pirálídeo ao produto de controle microbiano para a CL<sub>50/90h</sub> calculada, logo não apresenta relevância para os programas de MIP deste pirálídeo.

## 1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

AFIFY, E. M.; MATTER, M. M. Retarded effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fecundity of *Anagasta kuehniella* (Zell). **Entomophaga**, v. 14, n. 4, p. 447-456, 1969.

\_\_\_\_\_ et al. Increase tolerance to bacterial insecticides with larval development of *Anagasta kuehniella* Z., in relation to its microbial control. **Z. ang. Ent.**, v. 65, n. 1, p. 14-19, 1970.

ALI, M. I. et al. Host plant influence on activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against lepidopterous pests of crops. **J. Entomol. Sc.**, v. 39, n. 3, p. 311- 317, 2004.

AMARAL FILHO, B. F. **Estudos biológicos e patológicos de dois piralídeos pragas de produtos armazenados**. 1986. 167 f. Tese (Doutorado em Ecologia) -Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.

\_\_\_\_\_; HABIB, M. E. M. Efeito da variabilidade genética de *Anagasta kuehniella* na resposta de suas larvas a infecções causadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Rev. Agric.**, v. 68, n. 1, p. 89-98, 1993.

BRYANT, J. E. Application strategies for *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecos. Environ.**, v. 49, n.1, p. 65-75, 1994.

HABIB, M. E. M. **Histopathological studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* Zeller**. 1968. 178 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Agronomia, Universidade de Alexandria, Alexandria, Egito, 1968.

\_\_\_\_\_. **Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* para larvas de Lepidoptera e Diptera**. 1982. 132 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

- \_\_\_\_\_; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.
- \_\_\_\_\_. et al. Patogenicidade de dois formulados à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b) em larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep.:Pyralidae). **Bioikos**, v. 5, n. 2, p. 31-66, 1991.
- HADDAD, M. L. Análise de próbites. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.374- 383.
- McGAUGHEY, W. M. H. Moth control in stored grain: efficacy of *Bacillus thuringiensis* on corn and methods of evaluation using small bins. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 5, p. 835-839, 1978a.
- \_\_\_\_\_. Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 6, p. 923-925, 1978b.
- \_\_\_\_\_; DICKE, E. B. Methods of applying *Bacillus thuringiensis* to stored corn for moth control. **J. Econ. Entomol.**, v. 73, n. 2, p. 228-229, 1980.
- \_\_\_\_\_; JOHNSON, D. E. Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 80, n. 6, p. 1122-1126, 1987.
- NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (eds.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 124-146.
- THOMPSON, W. R. Use of moving averages and interpolation to estimate median effective dose. **Bacter. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 115-145, 1947.
- YAMVRIAS, C. Contribution a l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephestia) kuehniella* Zeller (Lépidoptère). **Entomophaga**, v. 7, n. 2, p. 101-159. 1962.

## **Capítulo 2: EFEITOS DE UM PRODUTO À BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* EM *Ephestia kuehniella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).**

**RESUMO:** Neste trabalho foram analisados os efeitos crônicos provocados por três concentrações (CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>70</sub>) e dois tempos de exposição (90 horas e permanente) de um produto à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no desenvolvimento dos imaturos de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes de tratamento em diferentes estádios larvais. Também foram avaliados os efeitos em adultos oriundos destas larvas, em termos de reprodução e longevidade, e efeitos adicionais (contato ou odor) do produto formulado com Btk sobre adultos recém-emergidos do piralídeo. Constatou-se uma redução significativa na viabilidade dos estágios imaturos do piralídeo, tratados durante o primeiro estágio larval (L1), estando relacionada à concentração e ao tempo de exposição ao patógeno. Já nos sobreviventes à exposição no quinto estágio a diminuição na viabilidade foi decorrente principalmente deste último fator. O tempo de desenvolvimento destas larvas L1 sobreviventes ao tratamento por 90 horas, nas três concentrações, foi significativamente maior que no grupo testemunha. Porém, na exposição permanente, o aumento no tempo e desenvolvimento foi muito mais expressivo ( $80,5 \pm 0,50$  dias) quando comparado ao do grupo testemunha ( $48,23 \pm 0,25$  dias). Os adultos obtidos de larvas de primeiro e terceiro estádios, sobreviventes à exposição ao inseticida microbiano por 90 horas, não apresentaram alterações na sua capacidade reprodutiva e longevidade. Todavia, aqueles obtidos a partir de larvas de último estágio (L5) diminuíram sua capacidade de oviposição, embora a viabilidade dos ovos e a longevidade não tenham sofrido impactos negativos. Foi observada uma ação direta da formulação do Dipel PM<sup>®</sup> sobre adultos de *E. kuehniella* expostos ao tratamento, a qual resultou em menor longevidade, provavelmente em decorrência do contato com o produto microbiano empregado.

## 2.1. INTRODUÇÃO

O entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) apresenta alto potencial para o controle de lepidópteros pragas, como *Ephestia kuehniella*, em ambientes de armazenamento de grãos e subprodutos (McGAUGHEY, 1978a, b, 1980a, b; AMARAL FILHO, 1986; HABIB *et al.*, 1991). Porém, os atuais métodos de aplicação de produtos que contém este entomopatógeno não garantem uma cobertura uniforme da superfície tratada. Assim, a movimentação dos insetos pode propiciar o encontro de refúgios onde o patógeno não esteja presente ou se encontre em concentrações menores que a aplicada (DULMAGE *et al.*, 1978; BRYANT, 1994).

Vários autores já destacaram a possibilidade dos produtos à base de Btk desencadearem, além dos efeitos agudos, efeitos crônicos em insetos sobreviventes a tratamento com este agente microbiano em concentrações subletais. Estes estão principalmente relacionados ao prolongamento do tempo de desenvolvimento larval, à redução na emergência de adultos e à redução da capacidade reprodutiva (JACOBS, 1951; YAMVRIAS, 1962; HABIB, 1968; AFIFY & MATTER, 1969; SALAMA *et al.*, 1981; MORRIS, 1982; WESELOH, 1983; NAVON, 1993). Todavia, a expressão dos efeitos crônicos depende da fase de desenvolvimento larval submetida ao tratamento com o patógeno (PEDERSEN *et al.*, 1997).

Componentes inertes presentes na formulação de alguns inseticidas também podem apresentar efeitos letais aos insetos. Estes podem apresentar ação de contato, além de terem ação decorrente do princípio ativo (FLEXNER *et al.*, 1986). Tais efeitos adicionais devem ser investigados, já que podem incrementar os níveis de controle populacional. Além deste fato, mudanças comportamentais podem ser desencadeadas devido a repelência ou deterência a componentes presentes na formulação de alguns produtos, o que pode ocasionar alteração em parâmetros biológicos, como desenvolvimento, longevidade e capacidade reprodutiva (ASANO, 1973; NAVON, 1993; RAMACHANDRAN *et al.*, 1993; GEBEL & THIERY, 1994).

As capacidades de identificar e de evitar a ingestão de alimentos tratados com formulações de Btk já foram comprovadas por alguns autores (RAMACHANDRAN *et al.*, 1993; STAPEL *et al.* 1998) e podem provocar o deslocamento das larvas para sítios alimentares onde a contaminação com o patógeno seja menor ou ausente, aumentando as possibilidades de sobrevivência dos insetos (BRYANT, 1994).



Sendo assim, análises sobre o impacto de efeitos crônicos decorrentes da aplicação de produtos formulados à base de Btk, em diferentes concentrações e períodos de exposição, sobre a praga-alvo são fundamentais para o sucesso de sua inserção em programas de manejo integrado, uma vez que estes fatores influem expressivamente sobre sua eficiência. O mesmo se aplica aos efeitos adicionais, não relacionados à ação entomopatogênica do Btk, mas de componentes inertes da formulação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis efeitos crônicos de diferentes concentrações e tempos de exposição a um produto comercial à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), no desenvolvimento, reprodução e longevidade *E. kuehniella*, tratada em diferentes estádios larvais (primeiro, terceiro e último estágio). Também se avaliou um possível efeito direto do produto sobre a longevidade de *E. kuehniella*. Visto que os adultos não se alimentam da farinha contaminada (HABIB, 1968), buscou-se investigar a possibilidade da formulação do Btk atuar sobre os adultos de *E. kuehniella* através do contato ou do odor do produto empregado

## **2.2. MATERIAL & MÉTODOS**

### **2.2.1. Avaliação dos efeitos crônicos de um produto à base de Btk em *Ephesia kuehniella*.**

A partir do estabelecimento de três concentrações (equivalentes à CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>70</sub>) de Btk, obtidas para o inseticida microbiano Dipel PM<sup>®</sup>, em larvas de primeiro (L1), terceiro (L3) e quinto (L5) estádios de *Ephesia kuehniella* tratadas por 90 horas, foram realizados bioensaios para verificar possíveis efeitos crônicos decorrentes da ação destas sobre pirálídeos sobreviventes ao tratamento.

Para as avaliações dos efeitos crônicos da formulação à base do agente patogênico em L1 foram utilizadas as concentrações de 0,02%, 0,05% e 0,11% de Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral. Para os tratamentos em L3 empregaram-se as concentrações de 0,07%, 0,16% e 0,25%. E para L5 os efeitos crônicos foram avaliados para as concentrações de 0,52%, 1,77% e 4,82%.

Em todos os experimentos realizados foram adotadas condições laboratoriais controladas de temperatura ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e de fotofase (12 horas).

**2.2.1.1. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,02%; 0,05% e 0,11%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de *E. kuehniella* tratadas no primeiro estágio (L1).**

Para tal avaliação foram realizados dois conjuntos de bioensaios. No primeiro, foram montadas quatro placas de Petri, contendo 20 larvas sobreviventes a tratamento por 90 horas em uma das três concentrações do produto microbiano em farinha de trigo integral (0,02%, 0,05% e 0,11%). As larvas foram, então, criadas em farinha de trigo integral. No segundo conjunto de bioensaios, para cada uma das três concentrações avaliadas neste trabalho, foram também montadas quatro placas onde as larvas (20 L1/placa) foram expostas permanentemente ao tratamento com o inseticida microbiano até a emergência dos adultos.

Para cada o conjunto de bioensaios, foi estabelecido um grupo testemunha composto por quatro placas de Petri, onde as larvas (20 L1/placa) foram criadas em farinha de trigo integral. Todas as placas permaneceram na sala de criação, sob condições laboratoriais controladas, até a emergência dos adultos. Foram realizadas observações diárias dos bioensaios e a data de emergência dos adultos foi anotada para posterior determinação do tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos. O número total de adultos obtidos em cada tratamento também foi observado para se estimar o efeito do produto à base de Btk sobre a viabilidade total dos estágios imaturos e a relação com o tempo de exposição.

**2.2.1.2. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,52%; 1,77% e 4,82%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de *E. kuehniella* tratadas no quinto estágio (L5).**

Para avaliação dos efeitos crônicos decorrentes da exposição por 90h ao produto à base de Btk foram montadas quatro placas de Petri, contendo 25 larvas L5 de *E. kuehniella* sobreviventes a tratamento em uma das três concentrações do produto microbiano em farinha de trigo integral (0,52%, 1,77% e 4,82%). Após este período as larvas foram transferidas para novas placas e criadas em farinha de trigo integral. Para a exposição permanente ao Dipel PM<sup>®</sup> também foram montadas, para cada concentração, quatro placas de Petri contendo 25 larvas L5. Estas ficaram em contato permanente com o tratamento até a emergência dos adultos.

Para cada conjunto de bioensaios foram montadas quatro placas contendo 25 larvas de do piralídeo, as quais foram alimentadas com farinha de trigo integral (grupos testemunha).

Realizaram-se observações diárias dos bioensaios até a emergência dos adultos para a avaliação da viabilidade dos estágios imaturos.

**2.2.1.3. Avaliação do efeito de três concentrações de produto à base de Btk sobre a reprodução e longevidade de adultos de *E. kuehniella* oriundos de larvas tratadas com o patógeno por 90 horas, em três estádios larvais.**

Nestes bioensaios foram avaliados os efeitos crônicos decorrentes da exposição larval no primeiro, terceiro e quinto estágio, ao produto comercial à base de Btk, em concentrações equivalentes às respectivas CL<sub>30/90h</sub>, CL<sub>50/90h</sub> e CL<sub>70/90h</sub>. Para cada um dos três estádios larvais avaliados foram montadas quatro placas com 25 indivíduos de *E. kuehniella*, contendo uma das três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral. Após 90 horas de exposição ao tratamento, as larvas sobreviventes foram transferidas para placas limpas contendo farinha de trigo integral.

As placas foram observadas diariamente até a emergência dos adultos. Estes foram sexados e os casais obtidos foram individualizados em frascos coletores, fechados com “tully”. Os ovos foram coletados diariamente e contados sob microscópio

estereoscópico, para a determinação da capacidade reprodutiva. Ovos provenientes de fêmeas de cada tratamento foram observados para a avaliação do período de desenvolvimento embrionário e viabilidade do estágio. A longevidade desses adultos acasalados também foi calculada.

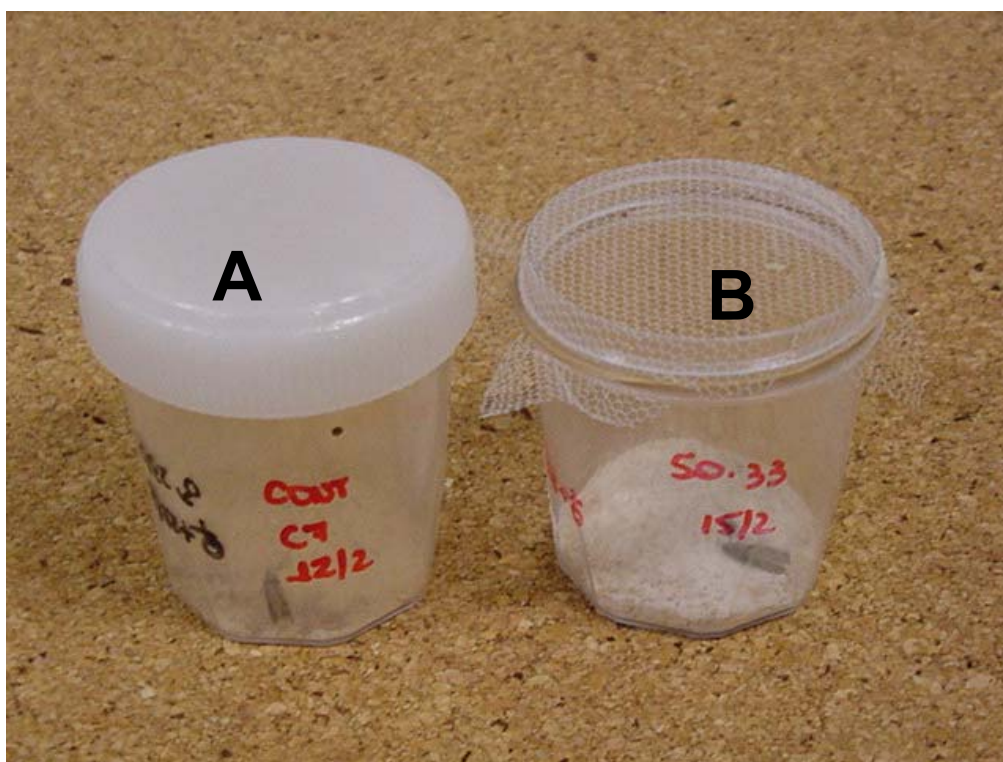
### **2.2.2. Efeito direto de produto à base de Btk sobre a longevidade de adultos de *E. kuehniella*.**

Para estes bioensaios, 35 casais de *E. kuehniella* recém emergidos foram individualizados em frascos plásticos (80 ml) tampados, onde tinham contato com três gramas de farinha com Dipel PM<sup>®</sup>, em uma das concentrações avaliadas (0,52%, 1,77% e 4,82%), simulando um ambiente fechado (Figura 13A). O mesmo procedimento foi adotado para um outro grupo de 35 casais, os quais foram colocados em frascos com a abertura coberta por *tully*, preso por elástico, para simular um ambiente ventilado (Figura 13B). Também foi estabelecido um grupo testemunha para cada caso, tratado com farinha de trigo integral.

Para complementar o conjunto de dados obtidos, realizou-se um novo conjunto de bioensaios. Neste se buscou verificar o efeito do produto puro (três gramas de Dipel PM<sup>®</sup>) em duas situações:

1. frascos plásticos (80ml) foram fechados durante o experimento, criando micro-ambiente saturado com o odor do produto formulado;
2. os frascos foram fechados com “*tully*”, permitindo a troca de ar com o ambiente externo.

Para cada situação foram individualizados 30 casais, para o grupo testemunha do tratamento, que receberam apenas farinha de trigo integral.



**Figura 13.** Frascos com casais de *Ephestia kuehniella* expostos ao contato Dipel PM<sup>®</sup>, em ambiente fechado (A) e ventilado (B).

Realizou-se um conjunto de bioensaios para se verificar o efeito do odor do Dipel PM<sup>®</sup> sobre a longevidade de adultos de *E. kuehniella*. Neste, 30 casais recém-emergidos (0 a 10h) foram individualizados em frascos plásticos (80ml). Estes frascos foram fechados com *tully* e colocados com a abertura voltada para baixo sobre um suporte. O suporte foi fixado sobre uma tampa, onde se encontravam três gramas de uma das três concentrações do inseticida microbiano em farinha de trigo integral anteriormente mencionadas (0,52%, 1,77% e 4,82%), isolados por uma tela de “voil” (Figura 14).

O mesmo número de casais foi individualizado para o grupo testemunha, porém os frascos destes foram colocados sobre tampas com farinha de trigo integral.



**Figura 14.** Frasco para exposição de adultos de *Ephesia kuehniella* ao odor de Dipel PM<sup>®</sup> e isolados do contato com o produto.

Em todos os bioensaios os frascos foram observados diariamente e as mortalidades de machos e de fêmeas foram registradas para a análise da longevidade dos adultos em cada tratamento.

### **2.2.3. Análise dos dados**

Os dados obtidos foram analisados no programa SYSTAT (versão 5.0) (SYSTAT, Inc) utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey.

## **2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1. Avaliação dos efeitos crônicos de um produto à base de Btk em *Ephesia kuehniella*.**

A análise dos efeitos crônicos de produtos à base de Btk sobre lepidópteros praga, levando-se em conta diferentes concentrações e tempos de exposição ao patógeno, é de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de manejo integrado. Os dados obtidos no presente trabalho, apresentados e discutidos em seguida, apontam a relevância destes fatores, demonstrando a heterogeneidade das respostas do piralídeo em função da idade que as larvas apresentavam no momento em que foram tratadas com o inseticida microbiano.

#### **2.3.1.1 Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,02%; 0,05% e 0,11%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de *E. kuehniella* tratadas no primeiro estágio (L1).**

Avaliando-se a sobrevivência das larvas de primeiro estágio, transferidas para a farinha sem o patógeno após 90 horas de tratamento com Dipel PM<sup>®</sup>, pode-se constatar que o impacto sobre a viabilidade dos estágios imaturos variou em função da concentração do produto utilizada no tratamento ( $F= 18,308$ ;  $P< 0,05$ ) (Tabela 6).

A viabilidade dos estágios imaturos de *E. kuehniella* sobreviventes à concentração de 0,02% do inseticida à base de Btk em farinha de trigo integral não diferiu estatisticamente do grupo testemunha e do grupo submetido a tratamento na concentração de 0,05%. Entretanto, diferiu do obtido no tratamento na concentração de 0,11%. Da mesma forma, encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre estas últimas concentrações.

Foi possível observar um grande impacto no grupo de larvas L1 sobreviventes ao tratamento com a maior concentração do formulado microbiano (0,11%), no qual se obteve menos de 50% de sobrevivência, utilizando-se o número de adultos emergidos como indicador.

**Tabela 6.** Efeitos de três concentrações de produto comercial à base de Btk na viabilidade dos estágios imaturos (%) de *Ephestia kuehniella* após tratamento no primeiro estágio larval por 90 horas.

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,02	0,05	0,11
<b>Viabilidade média ± E.P. (%)</b>	95,00 ± 2,04 a	76,25 ± 4,73 a,b	66,25 ± 7,74 b	45,00 ± 2,98 c

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Já no grupo de larvas de primeiro estágio que foram expostos permanentemente às concentrações do produto à base de Btk em farinha de trigo integral, pôde-se observar que diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo testemunha em relação à viabilidade dos estágios imaturos ( $F = 1105,80$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 7). Observou-se que nos tratamentos onde se empregou exposição permanente às concentrações equivalentes à  $CL_{50/90h}$  e  $CL_{70/90h}$  a viabilidade foi nula. Somente no caso da concentração correspondente à  $CL_{30/90h}$  para este estágio (0,02%) obteve-se a emergência de adultos (2,5%).

**Tabela 7.** Efeitos de diferentes concentrações de produto à base de Btk na viabilidade dos estágios imaturos (%) de *Ephestia kuehniella*, tratada permanentemente a partir do primeiro estágio larval.

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,02	0,05	0,11
<b>Viabilidade média ± E.P. (%)</b>	93,75 ± 4,79 a	2,5 ± 2,89 b	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.



Em relação ao tempo de duração dos estágios imaturos pode-se observar que as larvas de *E. kuehniella*, sobreviventes ao tratamento com diferentes concentrações do produto à base de Btk por 90 horas, apresentaram alteração no seu desenvolvimento ( $F=29,60$ ;  $P< 0,05$ ) (Tabela 8). Em todas as concentrações avaliadas, o tempo de desenvolvimento foi significativamente superior ao do grupo testemunha. Entretanto, não se observou diferença entre os tratamentos com o inseticida microbiano. De forma geral, houve um acréscimo superior a dois dias no tempo de desenvolvimento dos imaturos oriundos de larvas L1 tratadas com o produto, independentemente da concentração empregada.

**Tabela 8.** Tempo de desenvolvimento (dias) dos estágios imaturos de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk, por 90h, no primeiro estágio larval.

	Concentração (%)			
	Testemunha (n=76)	0,02 (n=61)	0,05 (n=53)	0,11 (n=36)
<b>Tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos <math>\pm</math> E.P.</b>	47,80 $\pm$ 0,26 <i>a</i>	50,16 $\pm$ 0,26 <i>b</i>	50,91 $\pm$ 0,25 <i>b</i>	50,64 $\pm$ 0,34 <i>b</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Em relação ao tempo de desenvolvimento de *E. kuehniella* sobreviventes à exposição permanente ao produto à base de Btk, a partir do primeiro estágio larval, os efeitos negativos decorrentes foram bastante superiores aos obtidos nos tratamentos com tempo de exposição de 90 horas (Tabela 9).

Houve registro de emergência de adultos apenas no tratamento onde as larvas foram expostas à concentração de 0,02% do produto microbiano em farinha de trigo integral. Os dois adultos sobreviventes, obtidos nesta concentração, apresentaram um prolongamento bastante expressivo no tempo de desenvolvimento quando comparados ao grupo testemunha ( $F= 440,268$ ;  $P< 0,05$ ). Os indivíduos superaram 80 dias para saírem dos estágios imaturos e alcançarem a fase adulta, enquanto no grupo testemunha o período de desenvolvimento foi de cerca de 48 dias.

**Tabela 9.** Tempo de desenvolvimento (dias) dos estágios imaturos de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes a tratamento permanente com o produto à base de Btk a partir do primeiro estágio larval

	Concentração (%)	
	Testemunha (n=75)	0,02 (n=2)
<b>Tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos</b> <b>(Média ± E.P.)</b>	48,23 ± 0,25 <i>a</i>	80,5 ± 0,50 <i>b</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

McGAUGHEY (1978b) verificou que larvas de primeiro estágio de *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) e *Ephestia cautella* (Walker), ambas piralídeos pragas de produtos armazenados, apresentaram aumento no tempo de desenvolvimento quando criadas em diferentes concentrações de produtos contendo Btk. Estes dados também corroboram com os encontrados para *Agrotis ypsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) tratada com diferentes concentrações subletais de Bt var. *galleriae* HD-234, por períodos de tempo distintos, onde os autores constataram retardo no desenvolvimento dos imaturos (SALAMA & SHARABY, 1988). PEDERSEN *et al.* (1997) também observaram retardo no desenvolvimento larval de *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae) após tratamento com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Algumas espécies de lepidópteros têm capacidade comprovada de regeneração das células do epitélio intestinal após exposição a doses subletais de produtos à base de Btk (LOEB *et al.*, 2001). RAMACHANDRAN *et al.* (1993) observaram que larvas de *C. fumiferana* Clemens recuperam-se após serem transferidas de dieta contendo a toxina do Btk para dieta não contaminada. Porém, a duração do estágio larval estava diretamente relacionada ao tempo de exposição à dieta tratada. Desta forma, o aumento no tempo de exposição larval à ingestão do alimento contendo a toxina aumentou o tempo necessário para o desenvolvimento larval. Tais constatações podem explicar os dados obtidos para *E. kuehniella* no presente trabalho.

**2.3.1.2. Avaliação de efeitos crônicos de três concentrações de produto à base de Btk (0,52%; 1,77% e 4,82%) e do tempo de contato (90 horas e permanente) sobre o desenvolvimento de larvas sobreviventes de *E. kuehniella* tratadas no quinto estágio (L5).**

A viabilidade dos estágios imaturos de *E. kuehniella* tratada no último estágio larval, com uma das três concentrações de Dipel PM® por 90 horas, não diferiu estatisticamente da obtida para o grupo testemunha ( $F= 2,368$ ;  $P= 0,122$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Viabilidade dos estágios imaturos (%) de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes a tratamento por 90 horas com produto à base de Btk no quinto estágio larval.

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,52	1,77	4,82
<b>Viabilidade média ± E.P. (%)</b>	92,26 ± 4,50 <i>a</i>	94,23 ± 5,77 <i>a</i>	74,46 ± 12,08 <i>a</i>	70,00 ± 3,50 <i>a</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Porém, a viabilidade dos estágios imaturos, obtida na exposição permanente ao tratamento com o produto à base de Btk, apresentou diferença significativa entre o grupo testemunha e o tratamento com a concentração de 4,82% de Dipel PM® em farinha de trigo integral ( $F= 5,352$ ;  $P= 0,014$ ) (Tabela 11). Todavia, esta última não diferiu estatisticamente das demais concentrações avaliadas (0,52% e 1,77%).

**Tabela 11.** Viabilidade dos estágios imaturos (%) de *Ephesia kuehniella* sobreviventes à exposição permanente ao produto à base de Btk a partir do quinto estágio larval.

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,52	1,77	4,82
<b>Viabilidade</b> <b>(média ± E.P.)</b>	100,00 ± 0,00 a	86,05 ± 7,26 ab	79,66 ± 4,33 ab	74,00 ± 4,63 bc

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

É possível que esta diminuição na viabilidade, bastante evidente na concentração de 4,82%, se deva ao fato do produto à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* poder provocar inibição alimentar e o abandono do alimento em decorrência da bacteriose ou de algum componente do produto formulado (ASANO *et al.*, 1973; GOULD *et al.*, 1991; BRYANT, 1994; HABIB & ANDRADE, 1998). Pode-se supor que as larvas, sobreviventes ao tratamento com a farinha contaminada, empupariam como mecanismo de escape à exposição ao patógeno, procurando garantir sua sobrevivência. Todavia, não estariam com as reservas necessárias ao processo em condições ideais, o que levaria a um aumento na taxa de mortalidade do estágio pupal, diminuindo a viabilidade dos estágios imaturos.

### 2.3.1.3. Avaliação do efeito de três concentrações de produto à base de Btk sobre a reprodução e longevidade de adultos de *E. kuehniella* oriundos de larvas tratadas com o patógeno por 90 horas, em três estádios larvais.

Em relação à influência de diferentes concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> sobre a reprodução e longevidade de adultos de *E. kuehniella* sobreviventes ao tratamento, pode-se observar que o efeito variou em função da idade da larva ao ser exposta ao patógeno.

#### 2.3.1.3.1. Efeitos crônicos de um produto à base de Btk sobre adultos oriundos de larvas tratadas no primeiro estágio.

O número médio de ovos das fêmeas de *E. kuehniella*, oriundas de larvas de primeiro estágio expostas durante 90 horas ao produto à base de Btk, nas três concentrações propostas (0,02%; 0,05% e 0,11%), não diferiu estatisticamente do grupo testemunha ( $F=0,295$ ;  $P=0,829$ ) (Tabela 12). Em todos os casos as fêmeas colocaram em média entre 202 e 227 ovos. Desta forma, pode-se constatar que aquelas sobreviventes ao tratamento com o inseticida microbiano neste estágio larval não sofrem alterações no processo de oogênese e, conseqüentemente, na sua capacidade reprodutiva.

**Tabela 12.** Número de ovos por fêmea de *Ephestia kuehniella* sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no primeiro estágio larval, durante 90 horas.

Concentração (%)	Número de ovos/ fêmea	
	n	Média ± E.P.
Testemunha	19	202,58 ± 16,73 a
0,02	16	219,93 ± 19,86 a
0,05	19	205,90 ± 18,14 a
0,11	12	227,92 ± 32,82 a

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Analisando-se a viabilidade dos ovos obtidos destas fêmeas, também se constatou que não há nenhuma alteração causada pelas diferentes concentrações do patógeno ( $F=0,494$ ;  $P=0,687$ ). O mesmo se aplica ao período de desenvolvimento embrionário do piralídeo ( $F=1,396$ ;  $P=0,186$ ), onde este foi cerca de 4 dias em todos os tratamentos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) em oviposições de fêmeas de *Ephestia kuehniella* sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk no primeiro estágio larval, durante 90 horas (n=20/ tratamento).

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,02	0,05	0,11
<b>Viabilidade (%) ± E.P.</b>	98,96 ± 0,46 A	97,83 ± 1,12 A	98,81 ± 0,59 A	98,22 ± 0,67 A
<b>Tempo de desenvolvimento embrionário ± E.P. (dias)</b>	3,85 ± 0,13 a	3,85 ± 0,17 a	4,25 ± 0,18 a	4,10 ± 0,17 a

- Médias, na horizontal, seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Também não foram detectados efeitos das diferentes concentrações do produto à base de Btk na longevidade de adultos do piralídeo (Tabela 14). Tanto as fêmeas ( $F=0,126$  e  $P=0,994$ ), quanto os machos ( $F=0,295$  e  $P=0,829$ ) obtidos nos tratamentos, apresentaram longevidade semelhante ao do grupo testemunha; independentemente da concentração utilizada.

Observou-se que as fêmeas de *E. kuehniella* apresentaram menor longevidade que os machos. Outros autores já observaram o mesmo padrão neste piralídeo (ALTAHTAWY *et al.*, 1973; STEIN, 1985; AMARAL FILHO & HABIB, 1990; CABRAL, 2000). Porém, obtiveram períodos de longevidade divergentes dos constatados neste trabalho, pois

adotavam na criação do pirálídeo outras dietas e condições laboratoriais, sendo que tais fatores influenciam expressivamente o inseto.

**Tabela 14.** Longevidade (dias) de adultos de *Epehestia kuehniella* oriundos de larvas de primeiro estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base de Btk, por 90 horas.

Concentração (%)	Longevidade média $\pm$ E.P.	
	Fêmeas (n)	Machos (n)
Testemunha	6,79 $\pm$ 0,36 a (19)	13,11 $\pm$ 0,62 A (19)
0,02	6,87 $\pm$ 0,53 a (15)	13,36 $\pm$ 0,41 A (14)
0,05	6,72 $\pm$ 0,38 a (18)	13,74 $\pm$ 0,33 A (19)
0,11	6,83 $\pm$ 0,30 a (13)	13,08 $\pm$ 0,98 A (12)

- Médias na vertical, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

#### 2.3.1.3.2. Efeitos crônicos de um produto à base de Btk sobre adultos oriundos de larvas tratadas no terceiro estágio.

A avaliação da capacidade reprodutiva de adultos de *E. kuehniella*, sobreviventes de tratamento por 90 horas com o produto à base de Btk durante o terceiro estágio larval, demonstrou que o impacto das concentrações empregadas é nulo. Os números médios de ovos obtidos das fêmeas sobreviventes aos tratamentos com a CL<sub>30/90h</sub> (0,07%), CL<sub>50/90h</sub> (0,16%) e CL<sub>70/90h</sub> (0,25%) não diferiram estatisticamente do obtido para o grupo testemunha ( $F = 1,287$ ;  $P = 0,286$ ) (Tabela 15). A viabilidade e o tempo de desenvolvimento embrionário dos ovos obtidos destas fêmeas sobreviventes aos três tratamentos com o agente patogênico também não diferiram do grupo testemunha ( $F = 0,545$  e  $P = 0,655$ ;  $F = 1,287$  e  $P = 0,286$ , respectivamente) (Tabela 16).

**Tabela 15.** Número de ovos por fêmea de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no terceiro estágio larval, durante 90 horas.

Concentração (%)	n	Número de ovos/ fêmea Média ± E.P.
Testemunha	12	217,083 ± 28,11 <i>a</i>
0,07	18	268,333 ± 22,17 <i>a</i>
0,16	20	277,95 ± 21,15 <i>a</i>
0,25	19	289,211 ± 19,389 <i>a</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

**Tabela 16.** Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) de ovos de fêmeas sobreviventes a tratamento com produto à base de Btk no terceiro estágio larval, durante 90 horas. (n= 20 oviposições/ tratamento)

	Concentração (%)			
	Testemunha	0,07	0,16	0,25
Viabilidade das oviposições ± E.P.	98,53 ± 0,70 <i>a</i>	98,42 ± 0,55 <i>a</i>	96,92 ± 1,74 <i>a</i>	96,55 ± 0,91 <i>a</i>
Tempo de desenvolvimento embrionário ± E.P.	3,95 ± 0,15 <i>A</i>	4,05 ± 0,14 <i>A</i>	4,00 ± 0,07 <i>A</i>	4,15 ± 0,08 <i>A</i>

- Médias, na horizontal, seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.



A longevidade das fêmeas também não foi alterada ( $F=0,543$ ;  $P=0,655$ ) (Tabela 17). Em todos os casos, a longevidade média foi em torno de sete dias, o que não diverge dos dados obtidos para aquelas oriundas de larvas tratadas no primeiro estágio. Pode-se observar que os machos também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à longevidade ( $F= 0,05$ ;  $P= 0,978$ ). Tanto nos três tratamentos com Btk, como no grupo testemunha, a longevidade média foi de aproximadamente 14 dias .

**Tabela 17.** Longevidade (dias) de adultos de *Ephestia kuehniella* obtidas a partir de larvas de terceiro estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base de Btk, por 90 horas.

Concentração (%)	Longevidade $\pm$ E.P.	
	Fêmeas (n)	Machos (n)
Testemunha	7,75 $\pm$ 0,92 a (12)	14,35 $\pm$ 1,09 A (20)
0,07	7,18 $\pm$ 0,39 a (18)	14,75 $\pm$ 1,08 A (20)
0,16	7,95 $\pm$ 0,34 a (20)	14,40 $\pm$ 0,83 A (20)
0,25	7,84 $\pm$ 0,38 a (19)	14,85 $\pm$ 0,83 A (20)

- Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

#### 2.3.1.3.3. Efeitos crônicos de produto à base de Btk sobre adultos oriundos de larvas tratadas no quinto estágio.

Fêmeas de *E. kuehniella*, obtidas a partir de larvas de último estágio (L5) tratadas com diferentes concentrações de Dipel PM® em farinha de trigo integral, demonstraram alterações em relação à sua capacidade reprodutiva (Tabela 18). Os grupos tratados nas três concentrações propostas (0,52%; 1,77% e 4,82%), equivalentes às CL<sub>30/90h</sub>, CL<sub>50/90h</sub> e CL<sub>70/90h</sub> para este estágio, tiveram uma redução significativa no número médio de ovos por fêmea quando comparados ao grupo testemunha ( $F= 6,756$ ;  $P < 0,005$ ). Entretanto, não se

observou diferença estatística entre os três tratamentos que empregaram o produto à base de Btk, sendo que as fêmeas apresentaram capacidades reprodutivas semelhantes.

**Tabela 18.** Número de ovos/ fêmea de *Ephestia kuehniella*, sobreviventes a tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no quinto estágio larval, durante 90 horas.

Concentração (%)	Número de ovos/ fêmea	
	n	Média ± E.P.
<b>Testemunha</b>	19	257,63 ± 8,18 <i>a</i>
<b>0,52</b>	20	190,45 ± 16,21 <i>b</i>
<b>1,77</b>	19	172,74 ± 15,95 <i>b</i>
<b>4,82</b>	19	184,95 ± 16,16 <i>b</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

É possível que este impacto negativo seja decorrente da empupação precoce como estratégia de escape da bacteriose (HABIB & ANDRADE, 1998). Desta forma, as reservas nutricionais que deveriam ser acumuladas neste estágio são menores e implicariam na redução da capacidade reprodutiva, já que o adulto não se alimenta e todas as atividades reprodutivas dependem exclusivamente do que foi acumulado durante o estágio larval, principalmente no último estágio.

Embora, tenham sido evidenciados impactos negativos sobre a capacidade reprodutiva das fêmeas sobreviventes ao tratamento, o período de desenvolvimento embrionário e a viabilidade dos ovos obtidos destas não diferiram daqueles obtidos para ovos de fêmeas do grupo testemunha ( $F=0,461$ ,  $P= 0,711$  e  $F= 0,322$ ,  $P= 0,809$ , respectivamente) (Tabela 19). Tais dados corroboram com os obtidos por PEDERSEN *et al.* (1997).

**Tabela 19.** Viabilidade (%) e tempo de desenvolvimento embrionário (dias) de ovos de fêmeas de *Ephestia kuehniella* sobreviventes ao tratamento com diferentes concentrações de produto à base de Btk no último estágio larval, durante 90 horas. (n= 20 oviposições/ tratamento)

	Testemunha	Concentração (%)		
		0,52	1,77	4,82
<b>Viabilidade ± E.P.</b>	98,09 ± 0,94 <i>a</i>	98,01 ± 2,53 <i>a</i>	96,73 ± 0,92 <i>a</i>	96,87 ± 1,15 <i>a</i>
<b>Tempo de desenvolvimento embrionário ± E.P.</b>	4,05 ± 0,09 <i>A</i>	4,10 ± 0,10 <i>A</i>	3,95 ± 0,17 <i>A</i>	3,90 ± 0,07 <i>A</i>

- Médias, na horizontal, seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

Assim como o observado nos outros dois estádios larvais avaliados, o tratamento com Btk por 90 horas nas L5 não refletiu em alterações na longevidade dos adultos sobreviventes obtidos, independentemente da concentração do produto utilizada. Tanto fêmeas como machos não diferiram estatisticamente do grupo testemunha em relação a este parâmetro ( $F = 0,204$  e  $P = 0,893$ ,  $F = 0,266$  e  $P = 0,850$ , respectivamente) (Tabela 20).

**Tabela 20.** Longevidade (dias) de adultos de *Ephestia kuehniella* obtidos a partir de larvas de último estágio tratadas com diferentes concentrações de produto à base de Btk, por 90 horas.

Concentração (%)	Longevidade média $\pm$ E.P.	
	Fêmea (n)	Macho (n)
<b>Testemunha</b>	7,95 $\pm$ 0,36 <i>a</i> (20)	13,75 $\pm$ 0,77 <i>A</i> (20)
<b>0,52</b>	8,05 $\pm$ 0,41 <i>a</i> (20)	13,00 $\pm$ 0,83 <i>A</i> (20)
<b>1,77</b>	7,85 $\pm$ 0,44 <i>a</i> (20)	13,05 $\pm$ 0,85 <i>A</i> (20)
<b>4,82</b>	7,60 $\pm$ 0,49 <i>a</i> (20)	13,70 $\pm$ 0,69 <i>A</i>

- Médias na vertical, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.

A interação de *Bacillus thuringiensis* com lepidópteros está condicionada a fatores como: tempo de exposição, concentração do patógeno, idade do indivíduo tratado, condições ambientais, entre outros. Porém, características espécie específicas têm importância fundamental na determinação da intensidade do impacto da patogenia e no grau de influência destes fatores. Desta forma, há uma variação considerável nas respostas biológicas de diferentes espécies.

SALAMA *et al.* (1981) avaliaram o desenvolvimento de lepidópteros noctuídeos, pragas em algodão (*Spodoptera littoralis* Boisd. e *Heliothis armigera* Hübner) expostos a concentrações subletais de 2 variedades de Bt (vars. *kurstaki* e *entomocidus*) durante o primeiro estágio larval. Constataram que, assim como neste trabalho, não houve nenhuma correlação entre a longevidade dos adultos obtidos de larvas sobreviventes ao tratamento e a concentração do patógeno. Já SALAMA & SHARABY (1988) observaram que a longevidade de adultos de *Agrotis ypsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) sobreviventes de exposições a concentrações subletais de Bt var. *galleriae* HD-234 no seu primeiro estágio larval é negativamente alterada.

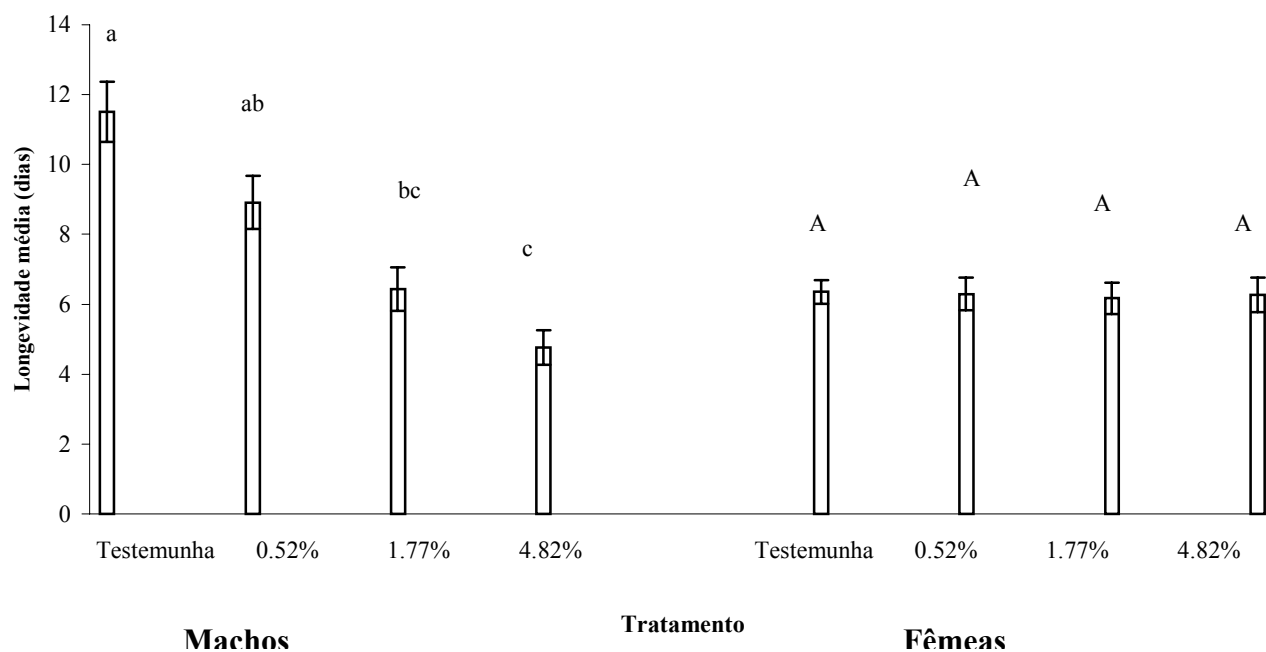
YAMVRIAS (1962) em seu trabalho sobre a ação de *Bacillus thuringiensis* var. *anduze* sobre *E. kuehniella* ressaltou que o estágio de desenvolvimento larval (idade da larva) pode influenciar na resposta ao patógeno. Larvas de último estágio, quando tratadas

com concentrações subletais apresentam menor potencial reprodutivo (número de ovos/fêmea), como observado neste trabalho. Porém, o autor não acompanhou a longevidade dos adultos tratados. A relação entre estágio larval tratado, concentração do Btk e longevidade é pouco abordada na literatura, apesar de sua importância no planejamento de programas de controle de pragas. Geralmente, avalia-se somente a relação entre os dois últimos fatores e o tempo de exposição, partindo-se sempre de tratamentos em larvas de primeiro estágio.

PEDERSEN *et al.* (1997) também demonstraram uma forte relação entre os efeitos crônicos e a idade larval no momento do tratamento. Em seu estudo com *C. fumiferana* Clemens observaram que adultos oriundos de larvas tratadas no último estágio com produto formulado à base de Btk, incorporado à dieta, apresentaram redução na capacidade reprodutiva, o que não foi constatado para os demais estágios avaliados. Todavia, não observaram alterações negativas sobre o desenvolvimento embrionário dos ovos obtidos das fêmeas tratadas em 3 diferentes estágios larvais. Tal resultado é bastante semelhante ao obtido neste trabalho.

### **2.3.2. Efeito direto de produto à base de Btk sobre a longevidade de adultos de *E. kuehniella*.**

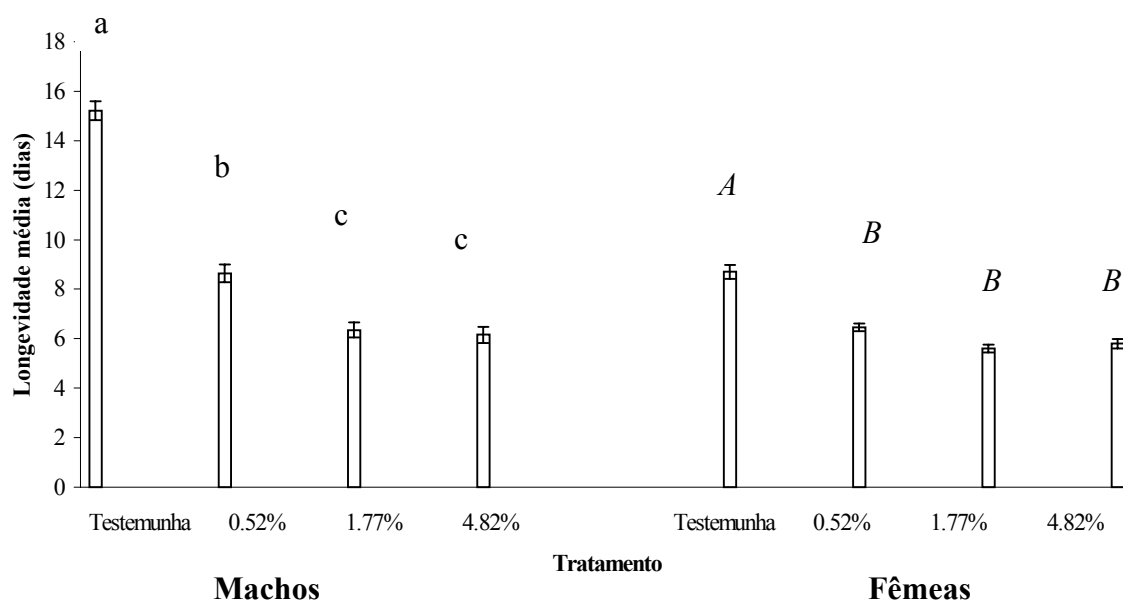
Constatou-se que, em um sistema ventilado, a longevidade de fêmeas do pirálídeo expostas a contato permanente com Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral, em uma das três concentrações avaliadas (0,52%; 1,77% e 4,82%) não diferiu do grupo testemunha ( $F=0,029$ ;  $P=0,993$ ). Já em relação aos machos sujeitos aos mesmos tratamentos demonstrou-se que o Btk apresenta uma relação inversa entre a concentração e a longevidade ( $F=17,509$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 15). Não se observou diferença estatística entre o grupo testemunha e o grupo tratado na concentração de 0,52%. Todavia, nas duas maiores concentrações a longevidade foi significativamente reduzida.



**Figura 15.** Longevidade média ( $\pm$  E.P.) de machos e fêmeas da *Ephestia kuehniella* expostos a três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> durante o estágio adulto, em recipiente ventilado.

Porém, quando o contato entre os adultos do piralídeo e a farinha de trigo integral contendo o produto à base de Btk ocorreu em frascos fechados foi possível observar diferenças ( $F= 28,162$ ,  $P< 0,001$ ) entre a longevidade das fêmeas do grupo testemunha e a dos três tratamentos contendo o produto formulado à base de Btk. Todavia, não houve diferença entre os três tratamentos que empregaram o inseticida microbiano (Figura 16).

Os machos tratados também tiveram longevidade significativamente inferior ao grupo testemunha ( $F= 82,737$ ,  $P< 0,001$ ). Entretanto, pode-se constatar para estes uma relação inversa entre longevidade e concentração utilizada nos bioensaios. O grupo testemunha diferiu de todos os tratamentos. Já o grupo de machos expostos ao contato direto na concentração de 0,52% mostrou-se mais longo vivo que os pertencentes aos grupos tratados com as concentrações de 1,77% e 4,82%.



**Figura 16.** Longevidade média ( $\pm$  E.P.) de adultos de *Ephestia kuehniella* expostos a três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup>, em recipiente fechado.

Observou-se que a presença do produto formulado puro, tanto em ambientes saturados (frascos fechados) como em ambientes com ventilação (frascos tampado com *tully*), apresenta um efeito bastante marcante sobre a longevidade de *E. kuehniella*. Nas duas situações avaliadas neste trabalho a longevidade dos adultos foi significativamente diminuída independentemente do sexo (Tabela 21).

Nos frascos fechados, a longevidade média das fêmeas que pertenciam ao grupo testemunha foi de  $6,07 \pm 0,32$  dias, enquanto a do grupo tratado com o Btk foi de  $1,77 \pm 0,08$  ( $t = 12,93$ , 29gl,  $P < 0,001$ ). Já os machos apresentaram longevidade média de  $11,47 \pm 0,91$  no grupo testemunha e  $1,73 \pm 0,08$  dias no grupo tratado ( $t = 10,46$ , 29gl,  $P < 0,001$ ). A diferença de longevidade entre os sexos que é bastante visível no grupo testemunha ( $t = 0,30$ , 29gl,  $P = 0,769$ ) não foi observada no grupo tratado com o Dipel PM<sup>®</sup> ( $t = 6,11$ , 29gl,  $P < 0,001$ ).

A mesma tendência de respostas observada no ensaio anterior, foi também constatada no ensaio com frascos com ventilação. Neste caso, tanto as fêmeas diferiram significativamente em termos de longevidade média (testemunha:  $6,63 \pm 0,30$ ; tratadas com Btk  $1,70 \pm 0,11$ ;  $t= 15,52$ , 29gl,  $P < 0,001$ ), quanto os machos (testemunha:  $11,02 \pm 1,12$ ; tratados com Btk:  $1,60 \pm 0,11$ ;  $t= 11,10$ , 29gl,  $P < 0,001$ ).

Também, não se observou diferença significativa entre ambos os sexos quando expostos à presença do produto puro ( $t=0,77$ , 29gl,  $P = 0,448$ ), o que não foi validado para os casais que compunham o grupo testemunha, já que a longevidade dos machos foi significativamente maior que a das fêmeas ( $t= 6,05$ , 29gl,  $P < 0,001$ ).

**Tabela 21.** Longevidade média ( $\pm$  E.P.) de adultos de *Ephestia kuehniella* expostos a Dipel PM<sup>®</sup> puro em frascos fechados ou ventilados.

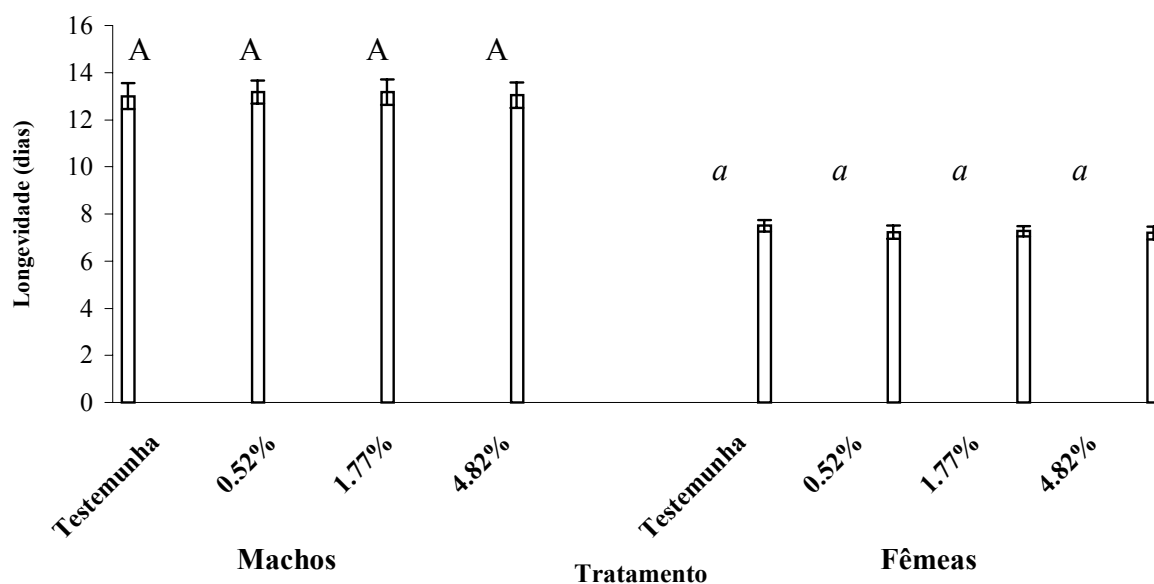
Frasco	Tratamento	Longevidade média $\pm$ E.P.	
		Fêmeas	Machos
Fechado	Btk	$1,77 \pm 0,08$ <i>a</i>	$1,73 \pm 0,08$ <i>A</i>
	Testemunha.	$6,07 \pm 0,32$ <i>b</i>	$11,47 \pm 0,91$ <i>B</i>
Ventilado	Btk	$1,70 \pm 0,11$ <i>a</i>	$1,60 \pm 0,11$ <i>A</i>
	Testemunha	$6,63 \pm 0,30$ <i>b</i>	$11,02 \pm 1,12$ <i>B</i>

- Médias na vertical, seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.



Os dados obtidos neste trabalho sobre a ação direta do formulado microbiano sobre os adultos de *E. kuehniella* indicam que o Dipel PM<sup>®</sup>, nas concentrações avaliadas, realmente apresentou uma ação direta sobre os adultos de *E. kuehniella*, não relacionada à ação do patógeno. Avaliou-se, então, se esta ação é decorrente do odor ou do contato com produto formulado empregado.

Nos bioensaios onde os adultos de *E. kuehniella* foram sujeitos apenas ao odor do Dipel PM<sup>®</sup>, ficando isolados do contato com o mesmo, observou-se a ausência de alterações estatisticamente significativas na longevidade tanto de machos ( $F = 0,027$ ;  $P = 0,994$ ), quanto de fêmeas do piralídeo ( $F = 0,276$ ;  $P = 0,843$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Longevidade média ( $\pm$  E.P.) de adultos de *Ephestia kuehniella* expostos ao odor de três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup>, em recipiente fechado.

Os machos do grupo testemunha (média =  $13,00 \pm 0,55$  dias) apresentaram longevidade média muito semelhante aos grupos tratados (0,52%: média =  $13,17 \pm 0,49$  dias; 1,77%: média =  $13,17 \pm 0,59$  dias; 4,82%: média =  $13,03 \pm 0,54$  dias). O mesmo foi observado entre os grupos de fêmeas testemunhas (média =  $7,5 \pm 0,25$  dias) e tratados (0,52%: média =  $7,23 \pm 0,28$  dias; 1,77%: média =  $7,27 \pm 0,22$  dias; 4,82%: média =  $7,20 \pm 0,22$  dias).

$\pm 0,27$  dias). Sendo assim, e tendo em vista os dados obtidos, há uma forte indicação de que o contato com o Dipel PM<sup>®</sup> seja o responsável pela mortalidade precoce em adultos de *E. kuehniella*, resultando em diminuição da longevidade. É válido ressaltar que o produto puro provocou um efeito de “*knockdown*” nos adultos do piralídeo, os quais permaneciam imóveis no fundo do frasco, comportamentos anômalos para esta categoria de insetos.

Já foi constatado que componentes utilizados na formulação de inseticidas, químicos ou biológicos, podem provocar mortalidade ou alterações comportamentais, como diminuição na atividade de cópula, aumento ou diminuição expressiva da atividade locomotora e etc, que modificam respostas biológicas relacionadas à longevidade e à capacidade reprodutiva (FLEXNER *et al.*, 1986; GEBEL & THIERY, 1994). Além disso, a mortalidade pode se manifestar de forma sexo-dependente, sendo que machos geralmente são mais sensíveis. Todavia a concentração do produto utilizada tem um papel fundamental na determinação da intensidade de resposta obtida nos insetos (SIMMONS & ROGERS, 1994).

Os resultados do presente trabalho são extremamente interessantes, visto que este possível efeito adicional do produto formulado poderia favorecer o controle de *E. kuehniella* em ambientes fechados ou semi-fechados, como silos, armazéns e moinhos. Todavia, este efeito também deve ser avaliado em termos de seletividade para a entomofauna benéfica presente em sistemas de armazenamento. Seria oportuno estimular pesquisas para o isolamento do (s) composto (s) responsável por tal efeito de mortalidade para poder avaliá-lo com maior exatidão.

## 2.4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que a idade das larvas de *E. kuehniella* no momento do tratamento, a concentração empregada e o período de exposição ao produto à base de Btk, são fatores bastante importantes na determinação dos efeitos crônicos nos sobreviventes.

Mesmo concentrações consideradas não ideais (subletais) para o controle do piralídeo foram responsáveis por efeitos crônicos. A exposição ao inseticida microbiano diminuiu a viabilidade dos estágios imaturos sobreviventes e aumentou o tempo de duração do desenvolvimento das larvas de primeiro estágio, sobreviventes ao tratamento. Adultos

obtidos de larvas sobreviventes, tratadas durante o quinto estágio, apresentaram diminuição na capacidade reprodutiva em decorrência do tratamento com o produto.

Além dos efeitos decorrentes da patogenia, componentes inertes presentes no formulado de Btk utilizado neste trabalho apresentaram efeitos adicionais sobre adultos de *E. kuehniella*, reduzindo sua longevidade. O impacto pode ser considerado sexo-dependente, pois os machos demonstraram maior sensibilidade às concentrações do Btk. Todavia, em presença do Dipel PM<sup>®</sup> puro, a resposta dos dois sexos foi semelhante.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, A. M.; MATTER, M. M. Retarded effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fecundity of *Anagasta kuehniella* (Zell). **Entomophaga**, v. 14, n. 4, p. 447-456, 1969.

ALTAHTAWY, M. M.; HAMMAD, S. M.; HABIB, M. E. M. Bionomics of *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Phycitinae). **Indian J. agri. Sci.**, v. 43, n. 10, p. 905-908, 1973.

AMARAL FILHO, B. F. **Estudos biológicos e patológicos de dois piralídeos pragas de produtos armazenados**. 1986. 167 f.Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.

\_\_\_\_\_; HABIB, M. E. M. Biologia de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev Agric.**, v. 65, n. 2, p. 133- 141, 1990.

ASANO, S.; NAKAMURA, K.; MATSUSHITA, Y. Some biological effects of *Bacillus thuringiensis* product on gypsy moth larva. **Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.**, v.1, n.1, p. 141-146, 1973.

BRYANT, J. E. Application strategies for *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecosystems Environ.**, v. 49, n.1, p. 65-75, 1994.

CABRAL, F. **Influência da alimentação de larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) no desenvolvimento de seu parasitóide natural, *Bracon***

**hebetor** Say 1836 (Hymenoptera, Braconidae) e sua tolerância à radiação de microondas (2450 MHz). 2000. 97 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

DULMAGE, H. T.; GRAHAM, H. M.; MARTINEZ, E. Interactions between the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and the d-endotoxin produced by HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: relationship between length of exposure to the toxin and survival. **J. Inv. Pathol.**, v. 32, n. 1, p. 40-50, 1978.

FLEXNER, J.L.; LIGHTHART, B.; CROFT, C.A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. **Agric. Ecosystems. Environ.**, v. 16, n. 3-4, p. 203-252, 1986.

GEBEL, B.; THIERY, D. Nonhost plant odor (*Tanacetum vulgare*, Asteraceae) affects the reproductive behavior of *Lobesia botrana* Dent et Schiff (Lepidoptera, Tortricidae). **J. Insect Behavior**, v. 7, n. 2, p.149-157, 1994.

GOULD, F. et al. Feeding behaviour and growth of *Heliothis virescens* larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulations or endotoxins. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 58, n. 1, p. 199-210, 1991.

HABIB, M. E. M. **Histopathological studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* Zeller.** 1968. 178 f.. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Agronomia, Universidade de Alexandria, Alexandria, Egito, 1968.

\_\_\_\_\_; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

\_\_\_\_\_ et al. Patogenicidade de dois formulados à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b) em larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879)(Lep.:Pyralidae). **Bioikos**, v. 5, n. 2, p. 31-66, 1991.

JACOBS, S. E. Bacteriological control of the flour moth, *Ephestia kuehniella*. **Proc. Soc. Appl. Bacteriol.**, v. 13, n. 1, p. 83-91, 1951.

LOEB, M. J. et al. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **J. Insect Physiol.**, n. 47, v. 4, p. 599-606, 2001.

McGAUGHEY, W. M. H. Moth control in stored grain: efficacy of *Bacillus thuringiensis* on corn and methods of evaluation using small bins. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 5, p. 835-839, 1978a.

\_\_\_\_\_. Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 6, p. 923-925, 1978b.

\_\_\_\_\_. Methods of applying *Bacillus thuringiensis* to stored corn for moth control. **J. Econ. Entomol.**, v. 73, n. 2, p. 228-229, 1980a.

\_\_\_\_\_. *Bacillus thuringiensis* for moth control in stored wheat. **Can Ent.**, v. 112, n. 3, p. 327-331, 1980b.

MORRIS, O. N. Bacteria as pesticides: forest application. In: KURSTAKI, E. (ed.). **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 239-287.

NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. ; HIGGS, S. (eds.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p.124- 146.

PEDERSEN, A. et al. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 83, n. 2, p. 253-262, 1997.

RAMACHANDRAN, R. et al. Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) toxin in diet. **Environ. Entomol.**, v. 22, n.1, p. 197-211, 1993.

SALAMA, H. S. et al. Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods. **J. Inv. Pathol.**, v. 38, n. 2, p. 220-229, 1981.

\_\_\_\_\_; SHARABY, A. F. Effects of exposure to sublethal levels of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) on the development of the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Hufn.). **J. Appl. Ent.**, v. 106, n. 4, p. 396-401, 1988.

SIMMONS, A. M.; ROGERS, C. E. Effect of an ectoparasitic nematode, *Noctuidonema guyanense*, on adult longevity and egg fertility in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Biol. Control**, v. 4, n. 3, p. 285-289, 1994.

STEIN, C.P. **Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para estudos com *Trichogramma***. 1985. 91p. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1985.

STAPEL, J. O. et al. Development and behavior of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in choice tests with food substrates containing toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Biol. Control**, v. 11, n.1, p. 29-37, 1998.

WESELOH, R. M.; ANDREADIS, T. G.; MOORE, R. E. B. Field confirmation of a mechanism causing synergism between *Bacillus thuringiensis* and the gypsy moth parasitoid, *Apanteles melanoscelus*. **J. Invert. Pathol.**, v. 41, n. 1, p. 99-103, 1983.

YAMVRIAS, C. Contribution a l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephestia) kuehniella* Zeller (Lépidoptère). **Entomophaga**, v. 7, n. 1, p. 101-159, 1962.

### **Capítulo 3: EFEITOS DE UM PRODUTO À BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* SOBRE *Bracon hebetor* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE).**

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi estudar o impacto da utilização de um produto comercial à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) para controle de *Ephestia kuehniella* sobre o seu ectoparasitóide larval, *Bracon hebetor*. Observou-se que a fase da bacteriose nas larvas de *E. kuehniella* infectadas e a concentração do produto à base de Btk na dieta oferecida às larvas hospedeiras influem na capacidade reprodutiva do parasitóide. Fêmeas que receberam larvas hospedeiras tratadas com altas concentrações de Dipel PM<sup>®</sup>, por um período de 72h, apresentaram menor porcentagem de parasitoidismo e capacidade reprodutiva. Nestas condições também se constatou uma diminuição significativa na viabilidade dos estágios imaturos da progênie do braconídeo. Tal fato está relacionado às condições das larvas hospedeiras infectadas, as quais apresentavam os sintomas mais graves e alta incidência de mortalidade decorrentes do desenvolvimento da patogenia devida ao Btk nesta fase. Entretanto, a longevidade dos adultos dos parasitóides que receberam como hospedeiras larvas tratadas com o produto microbiano em diferentes concentrações (0,52%; 1,77% e 4,82%) e tempos de exposição (24 e 72h) não foi alterada. A exposição ao contato com farinha contaminada com produto à base de Btk apresentou efeitos diretos sobre a longevidade de parasitóides adultos sadios. A longevidade de adultos alimentados com mel misturado com Dipel PM<sup>®</sup>, na concentração de 1,77%, também foi significativamente reduzida.

### 3. 1. INTRODUÇÃO

Programas de manejo integrado de pragas (MIP), utilizando uma combinação racional e específica de diversos métodos (higiene e sanitários, biológicos, técnicos, biotecnológicos, físicos e químicos), podem ser aplicados para a proteção de produtos agrícolas em ambientes de armazenagem, minimizando os efeitos negativos decorrentes da utilização exclusiva de métodos químicos (SCHÖLLER *et al.*, 1997). A própria legislação brasileira já incorporou este conceito. No Regulamento Técnico sobre as “Condições Higienico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos”, aprovado pela Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, há recomendação clara de que o controle de pragas nestes ambientes seja realizado prioritariamente através de programas abrangendo métodos preventivos, monitoramento e controle físico e biológico, enquanto a utilização de controle químico só deve ser feita em última instância (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1994, 1997). Sendo assim, a avaliação das interações estabelecidas entre diferentes agentes de controle aplicáveis em programas de MIP é de fundamental importância para garantir a sua eficiência contra os insetos-alvo (METCALF & LUCKMAN, 1982).

Patógenos e parasitóides são agentes de controle biológico de pragas amplamente utilizados. Entretanto, a associação entre estes em programas de manejo integrado de pragas deve ser avaliado, visto que a utilização de entomopatógenos simultaneamente com outros agentes de controle biológico pode apresentar três tipos de efeitos gerais: redução na disponibilidade do hospedeiro, antagonismo ou sinergismo entre os dois agentes (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998).

MAGALHÃES *et al.* (1998) revisaram aspectos sobre as interações entre parasitóides e bactérias e colocam como efeitos específicos relatados na literatura: aumento da susceptibilidade do hospedeiro, transmissão da infecção bacteriana, discriminação de larvas hospedeiras sadias e contaminadas, redução da população de hospedeiros e morte prematura do hospedeiro. Todavia, os mecanismos de interação são condicionados a uma série de variáveis espécie específicas e ambientais. E estas, por sua vez, determinam a eficiência de um programa de MIP para uma determinada espécie alvo.



Considerando-se a possibilidade da utilização de produtos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) associado a *Bracon hebetor* (Say, 1836) para o controle de *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879), em ecossistemas de armazenagem e em moinhos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto indireto de um produto comercial à base de Btk sobre o braconídeo, levando-se em conta fatores como a concentração do produto, o tempo de exposição do hospedeiro e efeitos adicionais da formulação não relacionados à ação do entomopatógeno .

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Mortalidade dos hospedeiros, capacidade de parasitoidismo, capacidade reprodutiva, desenvolvimento da progênie e longevidade de *Bracon hebetor* em larvas de *Ephestia kuehniella*, submetidas a tratamento com três concentrações de um produto à base de Btk, em dois tempos de exposição.

Para este estudo foram utilizadas larvas de último estágio (L5) de *E. kuehniella*, por estarem na fase de desenvolvimento preferencial de parasitoidismo por *B. hebetor* (CECÍLIO, 1993). Para o tratamento destas larvas do piralídeo foi empregado o produto comercial à base de Btk, Dipel PM<sup>®</sup>, em três concentrações (0,52%, 1,77% e 4,82%), equivalentes às suas CL<sub>30/90h</sub>, CL<sub>50/90h</sub> e CL<sub>70/90h</sub>, respectivamente. As larvas foram expostas ao consumo de farinha de trigo integral contendo o produto em uma das concentrações avaliadas por 24 ou 72 horas. Para a avaliação dos efeitos indiretos do produto à base de Btk no parasitóide, que recebeu larvas hospedeiras do piralídeo expostas à infecção por 24h, foram retirados aleatoriamente da criação matriz 180 casais recém emergidos de *B. hebetor* (45 casais / concentração). Já para aqueles que receberam larvas do piralídeo sujeitas a tratamento com o produto à base de Btk por 72h foram utilizados 88 casais do braconídeo (22 casais/ concentração). Cada casal foi individualizado em placa de Petri, contendo uma gota de mel e 5 larvas de último estágio de *E. kuehniella*. As larvas do piralídeo foram obtidas na criação matriz, separadas em placas de Petri e expostas ao consumo de determinada concentração de Btk durante um dos períodos de tempo propostos. Após o período de tratamento as larvas foram colocadas em farinha de trigo integral e oferecidas aos casais de *B. hebetor*.

Casais do parasitóide (tempo de exposição de 24h: n= 45; tempo de exposição de 72h: n= 22) foram utilizados como testemunhas de cada experimento. Cada um recebeu 5 larvas mantidas em farinha de trigo integral por um dos períodos de tempo avaliado, as quais foram trocadas diariamente.

Todos os casais foram trocados diariamente de placa até a constatação de sua morte. O número de larvas paralisadas ou infectadas, parasitoidadas, o número de ovos por fêmea e a longevidade dos casais foram registrados. As placas com larvas parasitoidadas foram separadas, numeradas, e os seguintes parâmetros foram avaliados na F1 do parasitóide: viabilidade dos estágios imaturos e razão sexual dos braconídeos emergidos.

### **3.2.2. Efeitos diretos do formulado à base de Btk na longevidade de adultos de *Bracon hebetor*.**

Os efeitos diretos do produto à base de Btk sobre *B. hebetor* foram avaliados em termos de efeitos de contato e efeitos de exposição à alimentação contendo Dipel PM<sup>®</sup> sobre a longevidade dos adultos do braconídeo.

Para avaliar o efeito do contato de *B. hebetor* com diferentes concentrações do produto microbiano formaram-se 5 grupos de tratamentos, cada um composto de 50 casais de *B. hebetor* recém emergidos (0 a 24h de idade). Cada casal foi individualizado em um frasco (20 ml) e submetido continuamente à exposição a uma das seguintes concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral (1g) de: 0% (testemunha), 0,52%; 1,77%; 4,82% e 100% (puro). Os adultos foram observados diariamente e sua longevidade foi avaliada.

Para avaliar se uma possível ingestão de Btk diluído em mel poderia afetar negativamente a longevidade do parasitóide foram individualizados 30 casais (0 a 24h de idade) do braconídeo em frascos plásticos (20 ml). Semanalmente cada casal recebia uma gota de mel com Dipel PM<sup>®</sup>, na concentração correspondente à CL<sub>50/90h</sub> do produto para larvas de último estágio de *E. kuehniella* (1,77%). O mesmo número de casais foi individualizado para compor o grupo testemunha, todavia estes foram alimentados apenas com mel, em quantidade equivalente a oferecida aos casais tratados com o formulado microbiano. Em ambos os grupos a longevidade foi avaliada, procedendo-se a observações visuais e anotando-se a data da morte de cada indivíduo.

Em decorrência dos resultados obtidos realizou-se um novo bioensaio, com três tratamentos:

1. alimentação com mel concentrado (1 gota);
2. alimentação com mel contendo Dipel PM<sup>®</sup> diluído a 1,77% (1gota);
3. sem alimentação.

Para cada tratamento foram individualizados 35 casais de adultos do braconídeo em frascos plásticos (20 ml). A troca de alimentação nos tratamentos 1 e 2 foi semanal. A longevidade também foi o parâmetro avaliado neste experimento.

### **3.2.3. Efeito da combinação entre Btk e *Bracon hebetor* no controle de *Ephesia kuehniella***

Para avaliar o impacto exercido no controle de *E. kuehniella* pela combinação simultânea de *B. hebetor* com o produto à base de Btk foram avaliados oito diferentes tratamentos. Para cada tratamento foram separados 30 frascos de plástico (10ml), cada um contendo cinco larvas de último estágio (L5) de *E. kuehniella*. Os tratamentos avaliados foram:

1. farinha de trigo integral (testemunha);
2. farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 0,52%;
3. farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 1,77%;
4. farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 4,82%;
5. farinha de trigo integral e 1 fêmea de *B. hebetor*;
6. uma fêmea de *B. hebetor* e farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 0,52%;
7. uma fêmea de *B. hebetor* e farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 1,77%;
8. uma fêmea de *B. hebetor* e farinha de trigo integral contendo Dipel PM<sup>®</sup> a 4,82%.

As fêmeas de *B. hebetor* utilizadas nos bioensaios tinham entre 48 e 72h de idade e experiência prévia de oviposição. As diferentes concentrações de Btk foram preparadas em farinha de trigo integral e homogeneizadas antes da pesagem e transferência para os frascos com as larvas do piralídeo. Cada frasco recebeu 1g de farinha tratada ou não com o

inseticida microbiano. Após 90 horas do início dos tratamentos, os frascos foram abertos e as larvas examinadas. A mortalidade foi computada e posteriormente submetida à análise.

#### **3.2.4. Análise dos dados**

Os dados obtidos foram analisados no programa SYSTAT (versão 5.0) (SYSTAT, Inc). Além dos parâmetros estatísticos de análise descritiva (média e erro padrão), utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ou teste t de Student para amostras pareadas.

### **3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A ação direta e indireta de Btk sobre *Bracon hebetor* estudada neste trabalho, e relatada a seguir, demonstra que a inserção de agentes de controle biológico em programas de MIP deve ser acompanhada de estudos prévios. Assim, os agentes que apresentam associações de compatibilidade ou sinergismo devem ser privilegiados para que a eficiência desejada no controle de pragas alvo possa ser alcançada.

#### **3.3.1. Mortalidade dos hospedeiros, capacidade de parasitoidismo, capacidade reprodutiva, desenvolvimento da progênie e longevidade de *Bracon hebetor* em larvas de *Ephestia kuehniella*, submetidas a tratamento com três concentrações de um produto à base de Btk, em dois tempos de exposição.**

Os parâmetros biológicos do parasitóide avaliados neste trabalho sofreram interferência bastante acentuada do tempo de exposição das larvas hospedeiras ao produto à base de Btk. Sendo assim, os resultados foram separados em blocos para a apresentação e discussão.

**3.3.1.1. Mortalidade de larvas de último estágio (L5) de *Ephestia kuehniella* sujeitas a parasitoidismo por *Bracon hebetor* após tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.**

Nos tratamentos onde o braconídeo recebeu larvas do piralídeo sujeitas a 24 horas de exposição ao produto à base de Btk constatou-se que a mortalidade larval do hospedeiro variou em função da concentração empregada no tratamento ( $F = 22,620$ ,  $P < 0,01$ ) (Tabela 22).

**Tabela 22.** Mortalidade (%) de larvas de último estágio (L5) de *Ephestia kuehniella* sujeitas a parasitoidismo por *Bracon hebetor* após tratamento em três concentrações com produto à base de Btk, por 24 e 72 horas.

		Mortalidade de larvas (%)
Tempo de exposição	Concentração (%)	(média $\pm$ E.P.)
24h	Testemunha	79,92 $\pm$ 9,58 a, A
	0,52	86,14 $\pm$ 8,03 b, B
	1,77	88,69 $\pm$ 4,63 b, BC
	4,82	93,13 $\pm$ 6,88 c, CD
72h	Testemunha	85,30 $\pm$ 8,41 a, ABCE
	0,52	96,72 $\pm$ 3,13 b, DF
	1,77	96,30 $\pm$ 2,30 b, DF
	4,82	98,70 $\pm$ 1,59 b, DF

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.
- Letras minúsculas: comparação dentro do mesmo tempo de exposição.
- Letras maiúsculas: comparação entre os dois tempos de exposição ao patógeno.

Foram observadas diferenças significativas entre a testemunha e os três tratamentos que empregaram o produto. Também se obteve diferenças entre a maior concentração (4,82%) e as demais concentrações (0,52% e 1,77%), sendo que estas últimas não diferiram entre si. O maior nível de mortalidade do lepidóptero (média = 93,13%) foi alcançado na combinação entre *B. hebetor* e a concentração equivalente à CL<sub>70/90h</sub> de Dipel PM<sup>®</sup> para larvas de último estágio de *E. kuehniella* (4,82%).

Nas concentrações equivalentes à CL<sub>30/90h</sub> (0,52%) e CL<sub>50/90h</sub> (1,77%) os valores médios de mortalidade obtidos foram inferiores, sendo que se obteve 86,14% e 88,69% de mortalidade nas larvas do hospedeiro, respectivamente. Na testemunha, a mortalidade média nas larvas, decorrente da exposição apenas ao parasitóide, foi de 79,92%. Este valor é muito semelhante aos obtidos por MAGRO & PARRA (2001) para o controle de *E. kuehniella*, em laboratório.

Nos tratamentos onde foram oferecidas larvas de *E. kuehniella* expostas à infecção por Btk por 72h, a porcentagem de mortalidade larval diferiu estatisticamente entre os tratamentos que empregaram o inseticida microbiano e a testemunha ( $F= 25,27$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 22). A porcentagem de controle do hospedeiro na testemunha também foi inferior às obtidas nos tratamentos com Dipel PM<sup>®</sup>, porém estas não diferiram entre si, apesar de terem sido utilizadas diferentes concentrações do produto.

Comparando-se os resultados obtidos para os dois tempos de exposição (24 e 72h) pode-se constatar que há diferenças significativas entre os dois grupos. A porcentagem de mortalidade de *E. kuehniella* diferiu estatisticamente em função do tempo de tratamento das larvas hospedeiras ( $F=23,77$   $P < 0,05$ ) (Tabela 22). O grupo testemunha, ao qual foram oferecidas larvas do hospedeiro que foram separadas da criação matriz e ficaram em farinha de trigo integral por 24h, apresentou menor porcentagem de mortalidade (79,92%) que aquele onde as larvas foram separadas 72h antes do bioensaio (85,30%). Todavia as diferenças observadas não foram significativas.

Quando os grupos tratados com as diferentes concentrações do patógeno são comparados a importância do tempo de exposição é evidenciada. No grupo onde as larvas foram sujeitas a tratamento por 24h com o produto na concentração de 0,52%, em farinha de trigo integral, a porcentagem de larvas hospedeiras mortas foi estatisticamente inferior (86,14%) ao obtido na mesma concentração no tratamento de 72h de exposição (96,72%). O mesmo se aplica à concentração de 1,77%, onde o valor em termos de mortalidade média no grupo tratado por 24h (88,69%) foi estatisticamente inferior ao obtido grupo do

tratamento de 72h (96,30%). O maior nível de mortalidade, comparando-se os dois tempos de exposição, foi obtido nos tratamentos de 72h.

TEMERAK (1980) também relatou que o aumento das concentrações de Bt combinadas com parasitóide implica em maior mortalidade do hospedeiro. Larvas de *Sesamia cretica* Lederer (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis*, em três diferentes concentrações, foram sujeitas ao parasitoidismo por *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) e os maiores níveis de mortalidade larval ocorrem na maior concentração do patógeno. Segundo o autor, “a abundância da bactéria no hospedeiro facilita a rápida imobilização pelo parasitóide”. ATWOOD *et al.* (1997) também relataram que associação de *Bacillus thuringiensis* com o parasitóide *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) resulta em maiores níveis de controle de *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae).

#### **3.3.1.2. Capacidade de parasitoidismo de *Bracon hebetor* em larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella* sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.**

Os casais de *B. hebetor* que receberam como hospedeiros as larvas de *E. kuehniella* expostas por 24 horas ao produto à base de Btk, em uma das três concentrações avaliadas no presente trabalho, não apresentaram alterações negativas em relação ao número médio de larvas parasitoidadas ( $F= 1,223$ ;  $P= 0,303$ ) (Tabela 23). Os tratamentos não diferiram do grupo testemunha, assim como não diferiram entre si. Possivelmente, isto se deve ao fato das larvas do hospedeiro ainda não estarem manifestando os sintomas mais evidentes da infecção por Btk. Externamente era impossível diferenciar-se as larvas infectadas das sadias.

**Tabela 23.** Parasitoidismo (%) de *Bracon hebetor* em larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, tratadas com três concentrações de um produto à base de Btk por 24 e 72 horas. (n=22/ tratamento)

Tempo de exposição	Concentração (%)	% de larvas parasitoidadas (média ± E.P.)
24h	Testemunha	35,25 ± 1,48 a, A
	0,52	37,95 ± 1,51 a, A
	1,77	37,71 ± 1,25 a, A
	4,82	34,74 ± 1,68 a, A
72h	Testemunha	39,46 ± 2,43 a, A
	0,52	33,33 ± 1,30 a, A
	1,77	23,06 ± 1,13 b, B
	4,82	18,44 ± 1,55 b, B

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.
- Letras minúsculas: comparação dentro do mesmo tempo de exposição.
- Letras maiúsculas: comparação entre os dois tempos de exposição ao patógeno.

De acordo com AFIFY *et al* (1970), apesar das alterações comportamentais do hospedeiro começarem a se manifestar após 12 horas do início da infecção por Bt, o tempo para registro das alterações histopatológicas ocasionadas por este entomopatógeno está relacionado positivamente com a concentração e o tempo de exposição utilizado. As alterações mais severas podem ser observadas a partir de 36h após o tratamento Segundo



DOUTT (1959) e VINSON (1976) a aceitação do hospedeiro depende de estímulos como odor, localização, tamanho e movimento, reconhecido pelo parasitóide. Desta forma, pode-se inferir que a falta de alterações nos estímulos utilizados por *B. hebetor* para a seleção de seu hospedeiro poderia levar à aceitação inclusive de hospedeiros doentes, mas ainda assintomáticos.

Nos tratamentos que empregaram larvas do piralídeo expostas a infecção pelo agente entomopatogênico, contido no produto avaliado, por 72h, constatou-se uma relação inversa entre a concentração e a porcentagem de larvas parasitoidadas ( $F= 34,101$ ,  $P < 0,05$ ) (Tabela 23). O efeito mais expressivo foi observado no tratamento com a concentração de 4,82% de Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral. Este apresentou a menor porcentagem de larvas parasitoidadas (média= 18,44%).

Deve-se ressaltar que as larvas após 72h de exposição ao patógeno já apresentavam sinais evidentes de infecção, o que poderia afetar a aceitação do hospedeiro pelo parasitóide. Sendo assim, apesar do parasitóide ter sido observado executando comportamentos para reconhecimento de seu hospedeiro, tamborilando as antenas e caminhando sobre hospedeiros doentes (flácidos e enegrecidos), a aceitação ocorreu com menor frequência, apesar de ovos de *B. hebetor* terem sido encontrados em larvas doentes ou mortas do piralídeo.

Comparando-se a porcentagem de parasitoidismo das larvas tratadas nos dois tempos de exposição observou-se diferença significativa ( $F= 13,514$ ,  $P < 0,05$ ). Fêmeas do braconídeo tratadas com larvas sujeitas ao produto à base de Btk por 72h, nas concentrações de 1,77% e 4,82%, apresentaram uma redução expressiva na sua capacidade de parasitoidismo, diferindo de todos os demais tratamentos.

### **3.3.1.3. Capacidade reprodutiva de *Bracon hebetor* em larvas de último estágio (L5) de *Ephestia kuehniella* sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.**

Nos tratamentos que empregaram larvas hospedeiras expostas ao produto microbiano por 24h não houve diferenças significativas em relação ao número médio de ovos postos por cada fêmea ( $F= 2,031$ ;  $P= 0,112$ ) (Tabela 24).

**Tabela 24.** Número de ovos por fêmea de *Bracon hebetor*, mantido com larvas de *Ephestia kuehniella* tratadas com produto à base de Btk em três concentrações e dois períodos de exposição.

Tempo de exposição	Concentração (%)	Número de ovos/ fêmea (média ± E.P.)
24h	Testemunha	160,74 ± 12,05 <i>a, A</i>
	0,52	154,35 ± 9,10 <i>a, AB</i>
	1,77	176,63 ± 11,08 <i>a, ABC</i>
	4,82	141,76 ± 7,36 <i>a, ABCD</i>
72h	Testemunha	169,38 ± 16,98 <i>a, ABCD</i>
	0,52	130,50 ± 12,90 <i>ab, ABCDE</i>
	1,77	112,13 ± 12,40 <i>bc, ABDEF</i>
	4,82	98,24 ± 7,2 <i>bc, DEF</i>

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey.
- Letras minúsculas: comparação dentro do mesmo tempo de exposição.
- Letras maiúsculas: comparação entre os dois tempos de exposição ao patógeno.

Já nos tratamentos onde as larvas hospedeiras foram tratadas por 72h, em umas das três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> avaliadas, houve diferenças significativas ( $F = 6,225$ ,  $P < 0,01$ ). O número de ovos depositados pelas fêmeas do braconídeo diminuiu com o aumento da concentração do produto na dieta do piralídeo, sendo que na concentração de 4,82% obteve-se a menor média em relação ao número de ovos/ fêmea ( $98,24 \pm 7,20$ ).

Comparando-se os dados obtidos para os dois tempos de exposição também se encontrou diferença estatisticamente significativa ( $F = 4,421$ ;  $P < 0,01$ ). Novamente, o

maior impacto da utilização do produto na capacidade reprodutiva do braconídeo ocorreu quando as larvas hospedeiras foram expostas por 72h ao Dipel PM<sup>®</sup>. A redução no número de ovos/ fêmea foi significativa na concentração de 4,82% quando comparada aos demais tratamentos. No entanto, esta não diferiu do obtido nas concentrações de 0,52% e 1,77%, neste mesmo tempo de exposição.

#### **3.3.1.4. Viabilidade dos estágios imaturos e razão sexual da progênie de *Bracon hebetor* obtida de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella* sujeitas a tratamento com produto à base de Bt, em três concentrações e dois tempos de exposição.**

Em relação à F1 obtida dos braconídeos que parasitoidaram larvas de *E. kuehniella* tratadas em três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> por 24h, a viabilidade dos estágios imaturos apresentou diferença significativa entre os quatro tratamentos ( $F= 39,187$ ,  $P < 0,05$ ) (Tabela 25). O aumento da concentração utilizada para o controle do hospedeiro implicou em diminuição progressiva do sucesso do parasitóide em produzir adultos.

No grupo testemunha cerca da metade (53 %) dos ovos depositados por fêmeas do braconídeo, em larvas tratadas de *E. kuehniella*, resultaram em adultos. Nos tratamentos, que empregaram para a alimentação das larvas hospedeiras farinha de trigo integral com o produto nas concentrações de 0,52% e 1,77%, a porcentagem de adultos obtidos foi intermediária (24,64% e 14,58%, respectivamente), sendo que o tratamento Dipel PM<sup>®</sup>, na concentração de 4,82%, reduziu drasticamente a viabilidade da progênie de *B. hebetor* (4,74 %), comprometendo em mais de 90% o sucesso do parasitóide em produzir sua progênie quando comparado ao grupo testemunha.

No que se refere ao tratamento de *B. hebetor* com larvas de *E. kuehniella* expostas ao produto à base de Btk por 72h, pode-se observar um efeito significativo do tratamento das larvas hospedeiras sobre a viabilidade dos estágios imaturos (Tabela 25). Há uma relação inversa entre a concentração utilizada e o sucesso dos braconídeos em produzir adultos. A maior porcentagem de adultos obtidos foi no grupo testemunha (61,68%). Nos tratamentos que empregaram as concentrações de 0,52% e 1,77% de Dipel PM<sup>®</sup> em farinha de trigo integral, não foi observada diferença estatística (36,42 e 25,12%, respectivamente).

**Tabela 25.** Viabilidade dos estágios imaturos (%) e razão sexual da progênie (F1) de *Bracon hebetor* criado em larvas de *Ephestia kuehniella* tratadas com produto à base de Btk, em três concentrações e dois diferentes tempos de exposição.

Tempo de exposição	Concentração (%)	Viabilidade dos estágios	
		imaturos (% média $\pm$ E.P.)	Razão sexual
24h	Testemunha	53,00 $\pm$ 4,14 a, A	0,45
	0,52	24,64 $\pm$ 2,30 b, B	0,53
	1,77	14,58 $\pm$ 1,94 bc, BC	0,53
	4,82	4,74 $\pm$ 1,70 c, CD	0,46
72h	Testemunha	61,68 $\pm$ 2,25 a, AE	0,50
	0,52	36,42 $\pm$ 7,51 b, ABF	0,51
	1,77	25,12 $\pm$ 2,62 c, BCFG	0,45
	4,82	14,93 $\pm$ 2,25 c, BCDG	0,44

- Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P > 95\%$ ), pelo teste de Tukey
- Letras minúsculas: comparação dentro do mesmo tempo de exposição.
- Letras maiúsculas: comparação entre os dois tempos de exposição ao patógeno.

Na concentração letal (4,82%), o impacto do patógeno foi mais expressivo, resultando na menor obtenção de adultos (14,93%), comprometendo profundamente o sucesso dos parasitóides em produzir sua progênie quando comparado com o sucesso obtido no grupo testemunha.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade dos estágios imaturos dos dois períodos de tratamento das larvas do hospedeiro ( $F= 29,771$ ;  $P < 0,05$ ). Todavia, estas diferenças foram devidas às diferentes concentrações, uma vez que o resultado obtido para cada um dos tratamentos foi estatisticamente equivalente entre o grupo tratado com larvas expostas ao produto à base de Btk por 24 e 72h (Tabela 25).

A redução da população de parasitóides, através da ação de Bt sobre seus hospedeiros, já foi relatada por outros pesquisadores. Este efeito indireto do patógeno sobre o parasitóide deve-se basicamente à morte do hospedeiro, que inviabiliza o desenvolvimento do parasitóide. NEALIS & VAN FRANKENHUYZEN (1990) observaram uma redução de até 60% na população de *Apanteles fumiferanae* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), devido a pulverizações de Bt para o controle de *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae). Segundo o autor, o patógeno levava o hospedeiro à morte antes da emergência dos parasitóides. SALAMA *et al.* (1991) também verificaram que a emergência de adultos de *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) é negativamente afetada pelo uso de *Bacillus thuringiensis*. A formação de pupas e emergência de adultos diferiu significativamente do grupo testemunha.

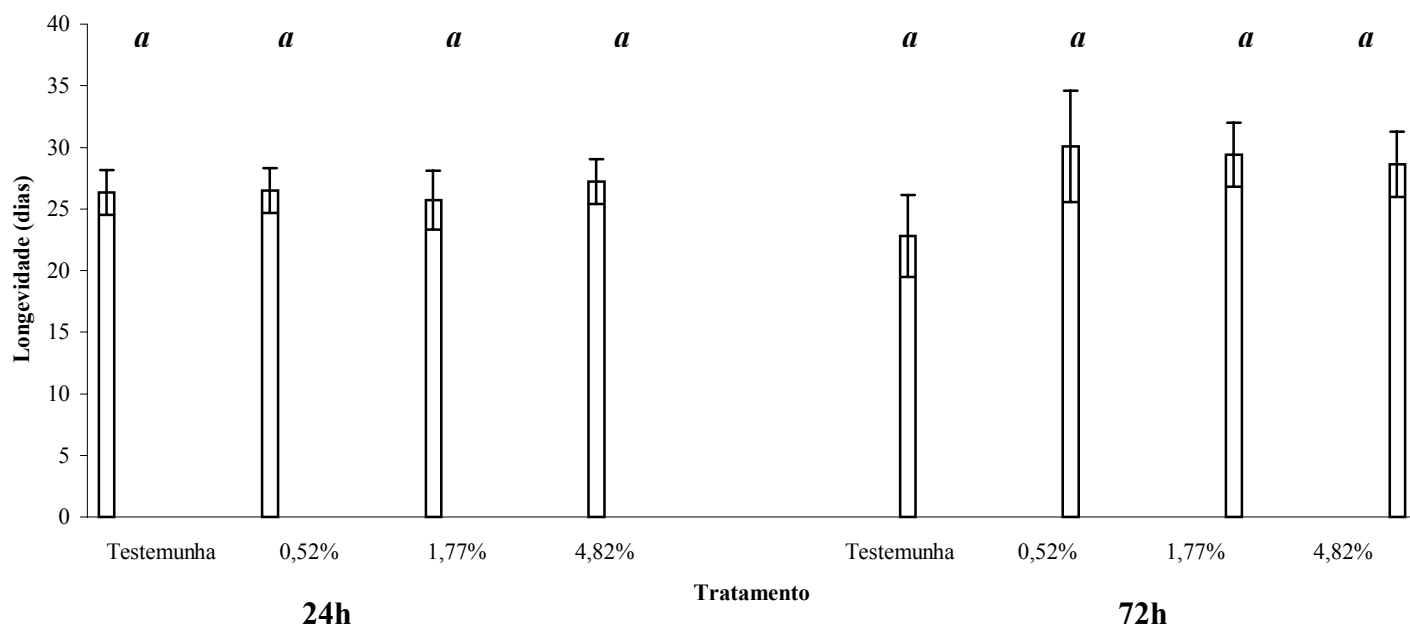
Os resultados obtidos neste trabalho, nas comparações sobre os possíveis efeitos do tempo de exposição das larvas do hospedeiro ao Bt sobre *B. hebetor*, se assemelharam aos obtidos por BLUMBERG *et al.* (1997) que trabalharam com as interações entre *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), seu endoparasitóide larval *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) e concentrações letais de *Bacillus thuringiensis*. Os autores também observaram que o parasitóide ovipôs em larvas infectadas. Entretanto, constataram efeitos adversos sobre a progênie somente no tratamento com larvas pré-infectadas por 72h.

No presente trabalho constatou-se que a razão sexual da F1 do braconídeo não foi afetada nem pela concentração do produto à base de Btk nem pelo tempo de exposição das larvas hospedeiras à bactéria (Tabela 25). WALLNER *et al.* (1983) observaram que doses subletais de *Bacillus thuringiensis* afetam a razão sexual de *Rogas lymantriae* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), diminuindo o número de fêmeas produzidas. O mesmo foi constatado por TEMERAK (1980) para *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae).

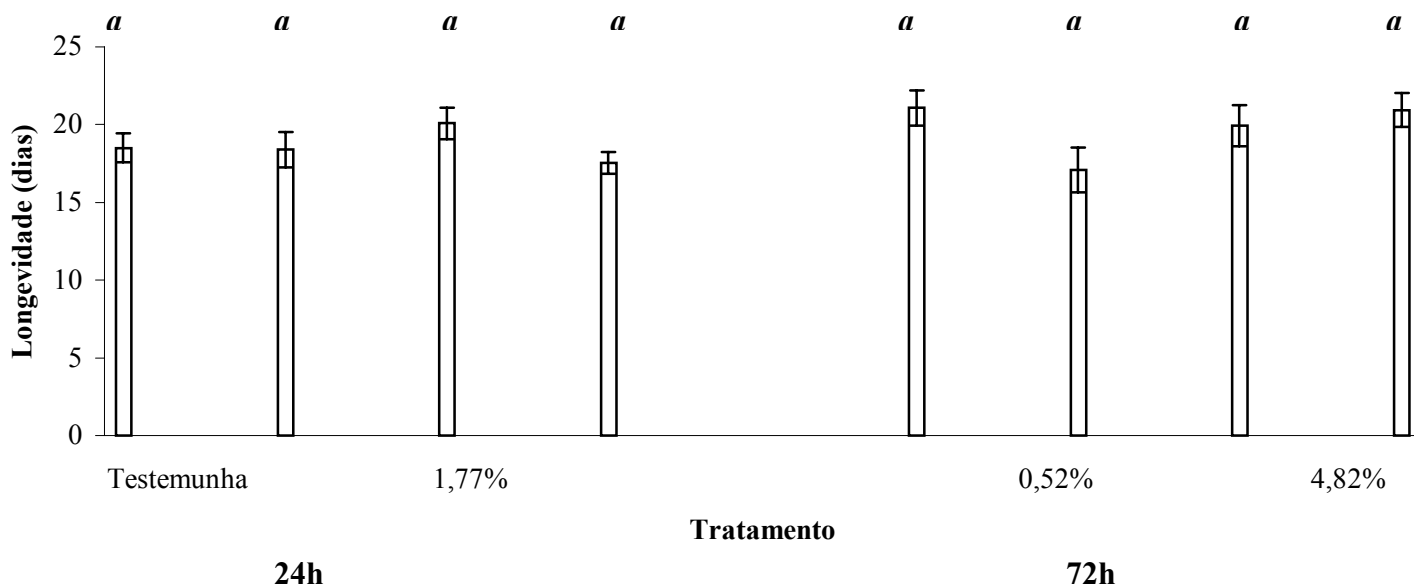
Provavelmente, a não alteração da razão sexual obtida em *B. hebetor* criado em larvas tratadas com Dipel PM seja decorrente do tipo de estratégia de parasitoidismo adotada por este micro-himenóptero. *B. hebetor* é um idiobionte e tem como hospedeiras preferenciais larvas de último estágio, enquanto as outras duas espécies de braconídeo (*R. lymantriae* e *B. brevicornis*) são cenobiontes e atacam estádios larvais iniciais e intermediários de seus hospedeiros. Doses subletais de Bt afetam as larvas hospedeiras, causando geralmente aumento no tempo de desenvolvimento e reduções no seu tamanho e peso, o que acarretaria em maior impacto no desenvolvimento de fêmeas do parasitóide que normalmente são mais exigentes nos seus requerimentos nutricionais. Entretanto, no caso específico de *B. hebetor*, as larvas atacadas já se encontram com suas reservas nutricionais asseguradas para suportar o desenvolvimento do parasitóides, não alterando então a proporção de machos e fêmeas da população. As larvas hospedeiras que resistiram à infecção pelo patógeno mostraram-se tão adequadas ao parasitoidismo quanto as não infectadas.

#### **3.3.1.5. Longevidade de adultos de *Bracon hebetor* que receberam como hospedeiras larvas de último estágio de *Ephesia kuehniella* sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, em três concentrações e dois tempos de exposição.**

A longevidade dos casais de parasitóides não foi alterada pelo produto à base de Btk utilizado na dieta das larvas do hospedeiro (Figuras 18 e 19). Não foram constatadas diferenças significativas relacionadas com as concentrações do Dipel PM® utilizadas nos experimentos (fêmeas 24h:  $F= 1,237$ ,  $P= 0,298$ ; machos 24h:  $F= 10,401$ ,  $P= 0,9567$ ; fêmeas 72h:  $F= 1,952$ ,  $P= 0,130$ ; machos 72h:  $F= 0,9179$ ,  $P=0,5586$ ). Também não se observou relação com os tempos de exposição (fêmeas:  $F= 1,486$ ,  $P= 0,1727$ ; machos:  $F= 0,5284$ ;  $P= 0,8153$ )



**Figura 18.** Longevidade média ( $\pm$  E. P.) de machos de *Bracon hebetor* expostos a larvas tratadas com produto à base de Btk, em três diferentes concentrações, por dois períodos.



**Figura 19.** Longevidade média ( $\pm$  E.P.) de fêmeas de *Bracon hebetor*, expostas a larvas tratadas com produto à base de Btk, em 3 diferentes concentrações, por dois períodos.

A longevidade média dos adultos do braconídeo do grupo testemunha é semelhante à obtida por SERRA (1992) e CECÍLIO (1993) em seus estudos sobre a bioecologia de *B. hebetor*. Assim como já constatado por estes autores, os machos do braconídeo são significativamente mais longevos que as fêmeas (24h:  $F = 8,5364$ ,  $P < 0,01$ ; 72h:  $F = 4.5927$ ,  $P = 0,003$ ).

Os patógenos poderiam ter influência sobre a longevidade de parasitóides caso:

1. o adulto fosse susceptível a infecção pelo patógeno (MÜCK *et al.*, 1981) o que não ocorre naturalmente no caso de *B. hebetor*. Para a que a susceptibilidade ao Btk seja manifestada é necessário que o inseto tenha pH intestinal alcalino, enzimas proteolíticas e receptores de membrana específicos para ativação e reconhecimento das toxinas (FLEXNER *et al.*, 1986), características não comuns em parasitóides e predadores;
2. exudados do corpo das larvas infectadas, liberados no ato de paralisia do hospedeiro e que serviriam de fonte nutricional para o parasitóide não apresentassem a qualidade adequada. Tal mecanismo foi proposto por TEMERAK (1980), o qual observou que fêmeas de *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera, Braconidae) apresentavam menor longevidade quando sujeitas a parasitoidar larvas de *Sesamia cretica* Lederer (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas com Bt em sua cavidade abdominal;
3. fêmeas do braconídeo rejeitassem larvas infectadas como sítio de reprodução, reabsorvendo os ovos maduros (DOUTT, 1959) e conseqüentemente estendessem sua longevidade.

Entretanto, tais fenômenos não foram identificados no presente trabalho, assim como não foram evidenciados para *Apanteles litae* (Nixon) e *Bracon instabilis* Marshall (Hymenoptera: Braconidae) por SALAMA *et al.* (1996).

Tanto parasitóides quanto patógenos influenciam profundamente a dinâmica da população de seus hospedeiros apresentando alto potencial de regulação (HOCHBERG, 1989), Apesar destas categorias de inimigos naturais apresentarem características distintas, são ecologicamente homólogos, pois exploram os mesmos recursos e causam impactos semelhantes nas populações de seus hospedeiros (MAY & HASSELL, 1988; HOCHBERG, 1991). As interações entre estes são mais comuns que o esperado (VINSON & IWANTSCH, 1980). Sendo assim, o estudo das interações competitivas entre parasitóides e



patógenos é de extrema importância para a compreensão da dinâmica populacional dos hospedeiros e destes agentes, principalmente para as áreas de manejo de pragas e controle biológico.

A combinação de *Bacillus thuringiensis* e parasitóides para o controle de pragas é bastante complexa e apresenta resultados espécie específicos, tendo em vista que a atuação destes está correlacionada aos efeitos ocasionados na espécie hospedeira. De maneira geral, a competição entre estes inimigos naturais resulta em benefícios para o controle da praga alvo, aumentando a taxa de mortalidade no estágio larval (WOLLAM & YENDOL, 1976; ATWOOD *et al.*, 1997). Entretanto, o patógeno em questão pode ocasionar tanto efeitos benéficos quanto detrimentais na população de parasitóides, dependendo da sua atuação sobre o desenvolvimento da espécie hospedeira, da concentração utilizada e da estratégia empregada pelo parasitóide (de ovo, larval, pupal, idiobionte ou cenobionte). Geralmente, entomopatógenos, como o Btk, são inócuos sobre os adultos, mas podem ser nocivos a sua progênie se inviabilizam a utilização do hospedeiro (FLEXNER *et al.*, 1986).

Em parasitóides larvais cenobiontes, onde após o parasitoidismo o desenvolvimento do hospedeiro prossegue, o efeito do Btk pode variar em função do momento em que o hospedeiro ingeriu o patógeno (tempo decorrido antes ou após o parasitoidismo). Em *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), parasitóide de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), os efeitos de Btk variam com a concentração e o tempo decorrido entre o parasitoidismo e a exposição à bactéria. A emergência do parasitóide é prejudicada quando a exposição ao patógeno é realizada a menos de 48h da oviposição na larva hospedeira (ATWOOD *et al.*, 1997). Provavelmente, este tempo não é suficiente para que o parasitóide se desenvolva adequadamente na presença do patógeno. A relação entre concentração de Btk aplicada em *Pieris rapae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pieridae) e porcentagem de pupas de *Cotesia rubecula* Marshall (Hymenoptera: Braconidae) obtidas também foi inversa. Entretanto, as larvas do pierídeo foram menos susceptíveis à infecção pelo Btk quando previamente parasitoidadas por *C. rubecula*, pois o parasitoidismo diminui o consumo alimentar do herbívoro.

Já em *B. hebetor*, parasitóide larval idiobionte, a ingestão da dieta contendo o patógeno pela larva hospedeira só pode ocorrer antes do ato de parasitoidismo, uma vez que a larva sofre uma paralisia irreversível pela ação do ectoparasitóide. Sendo assim, se o Btk infectar seu hospedeiro antes do braconídeo teria uma vantagem competitiva sobre este, já

que o desenvolvimento da infecção bacteriana é mais rápido que o desenvolvimento do parasitóide. Com o recurso alimentar (hospedeiro) ao qual está limitado tornando-se progressivamente inadequado, a progênie do braconídeo é inviabilizada e desta forma a população deste estaria sujeita a quedas de densidade.

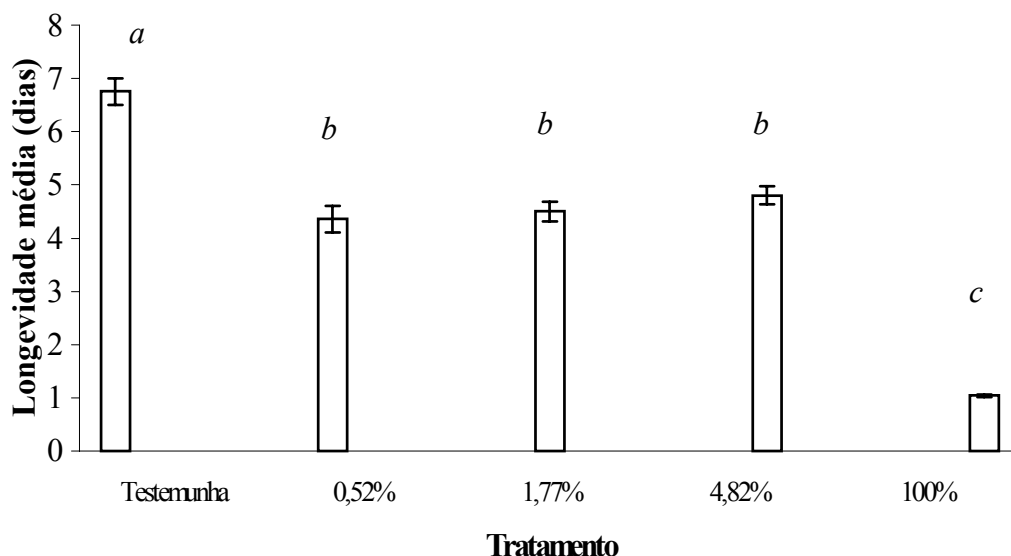
O mesmo raciocínio se aplica à estratégia de *B. hebetor* de paralisar um número maior de hospedeiros do que aqueles onde coloca ovos. A acumulação destes hospedeiros tem um papel importante na dinâmica populacional do braconídeo, pois permite que este tenha a disposição por um período de tempo, larvas hospedeiras que poderiam servir como alimentação para os adultos, permitindo maior longevidade, ou como sítio de reprodução e desenvolvimento da progênie, já que permanecem vivas por cerca de um mês (RICHARDS & THOMSON, 1932). Porém, a utilização de Btk para o controle larval de *E. kuehniella* poderia interferir drasticamente neste processo, afetando a manutenção da população do braconídeo.

Todavia, a inserção de Btk associado a *B. hebetor* para o controle de *E. kuehniella* em ambientes de armazenagem ainda deve ser investigada em situações reais de campo, pois vários fatores importantes podem estar sendo simplificados em situação de experimentação em laboratório.

### **3.3.2. Efeito direto do produto formulado à base de Btk na longevidade de adultos de *Bracon hebetor*.**

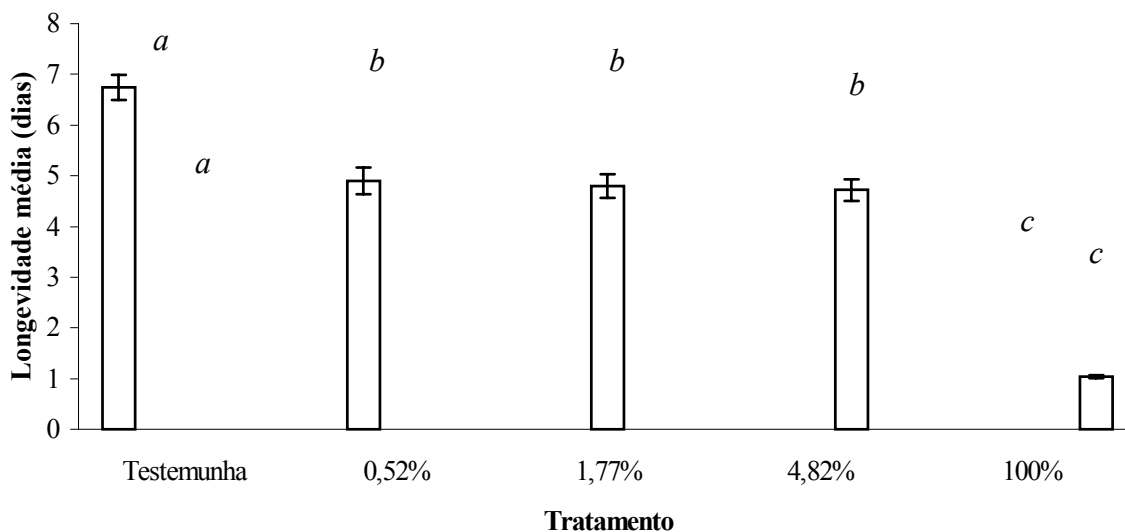
Tendo em vista a alteração na longevidade de adultos de *E. kuehniella* expostos ao Btk, avaliou-se a possibilidade do produto bacteriano também afetar diretamente os adultos do braconídeo através de seu odor e/ou contato.

Observou-se que as longevidades das fêmeas ( $F = 130,726$  e  $P < 0,05$ ) e dos machos ( $F = 132,308$  e  $P < 0,05$ ) do parasitóide diferiram significativamente de seus grupos testemunhas. Em ambos os casos houve mortalidade precoce e, conseqüentemente, redução na longevidade dos adultos na presença de cada uma das quatro concentrações do Btk utilizadas (Figuras 20 e 21, respectivamente). É importante ressaltar que no tratamento onde se empregou o produto formulado puro (concentração=100%) houve o maior impacto negativo. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si.



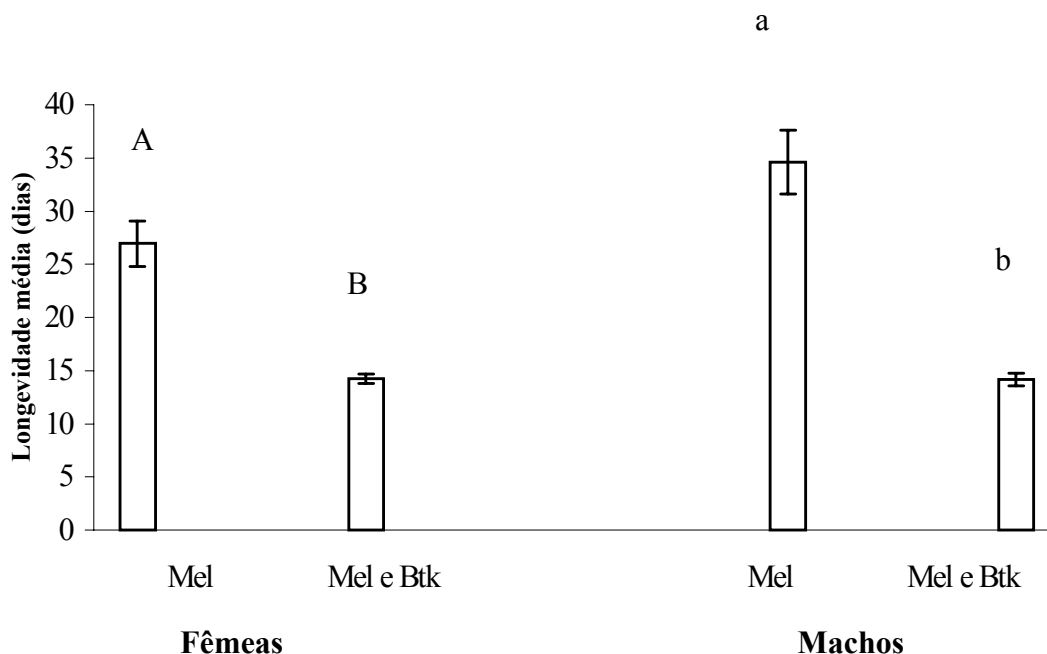
**Figura 20.** Longevidade média ( $\pm$  E. P.) de fêmeas adultas de *Bracon hebetor* expostas a diferentes concentrações de um produto à base Btk durante o estágio adulto, em recipiente fechado.

Este resultado reforça a hipótese de que componentes do produto (agentes inertes) sejam responsáveis pelo estresse nos indivíduos avaliados, alterando sua capacidade de sobrevivência. O tratamento utilizando Dipel PM<sup>®</sup> puro, embora apenas experimentalmente, teve um impacto bastante acentuado sobre ambos os sexos de *B. hebetor*, sendo que 96% dos insetos tratados morreram no decorrer das primeiras 24h de exposição. Resultado semelhante ao anteriormente obtido para *E. kuehniella* (ver capítulo 2). FLEXNER *et al.* (1986) exploraram em seu trabalho estes efeitos adicionais dos compostos inertes utilizados em formulações de inseticidas, relacionando-os ao aumento na mortalidade precoce e a alterações comportamentais que podem levar a diminuição da longevidade.



**Figura 21.** Longevidade média ( $\pm$  E. P.) de machos adultos de *Bracon hebetor* expostos a diferentes concentrações de produto à base de Btk durante o estágio adulto, em recipiente fechado.

Em relação à ingestão pelos adultos de mel misturado ao produto à base de Btk, na concentração de 1,77%, constatou-se que a longevidade de *B. hebetor* foi significativamente reduzida quando comparada ao grupo testemunha, o qual foi alimentado exclusivamente com mel (fêmeas:  $t = 5,81$ ; 29 gl;  $P < 0,05$ ; e machos:  $t = 7,09$ ; 29 gl;  $P < 0,05$ ) (Figura 22). De maneira geral, os indivíduos tratados sobreviveram aproximadamente à metade do tempo do grupo testemunha (fêmeas:  $26,93 \pm 2,14$  para a testemunha e  $14,23 \pm 0,45$  dias para o grupo tratado; machos:  $34,63 \pm 2,99$  para a testemunha e  $14,17 \pm 0,61$  dias para o grupo tratado)

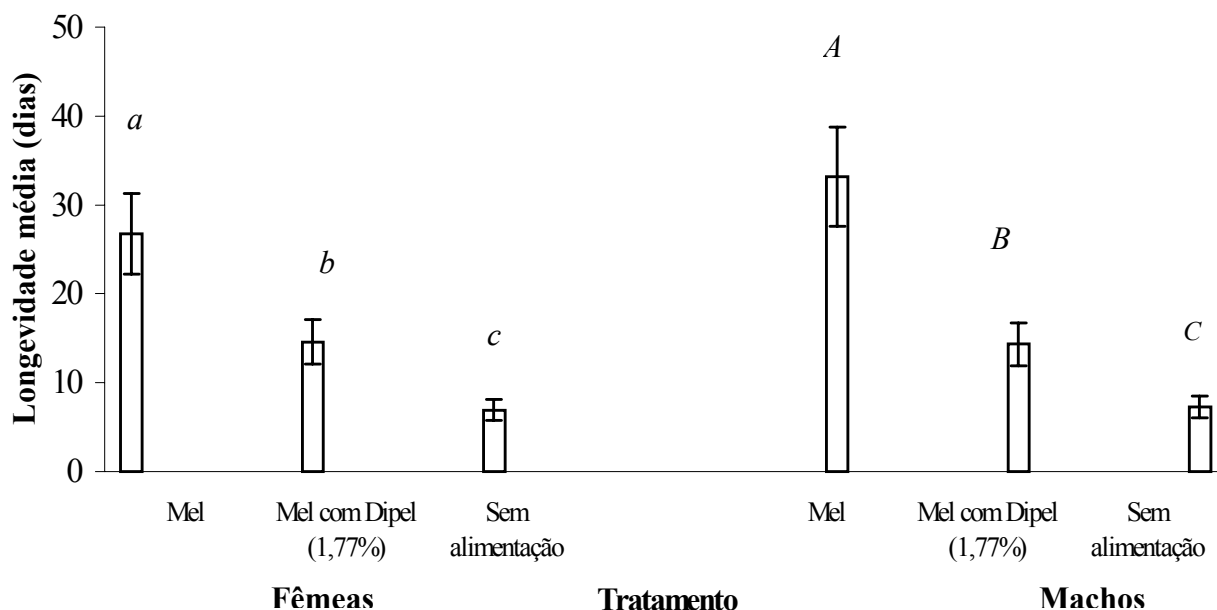


**Figura 22.** Longevidade média ( $\pm$  E. P.) de adultos de *Bracon hebetor* alimentados com mel contendo produto à base de Btk a 1,77%. (letra maiúscula: comparação de tratamentos com fêmeas; letra minúscula: comparação de tratamentos com machos)

Os adultos do parasitóide alimentaram-se das gotas contaminadas com o agente bacteriológico, mas a ingestão do alimento foi menor que no grupo testemunha. Enquanto no grupo testemunha a gota de mel foi totalmente consumida em quase 100% dos frascos, no grupo tratado com Btk a quantidade oferecida permaneceu praticamente intacta. Assim, esses adultos ao morrerem apresentavam o abdômen com aparência de colabamento, bastante discerníveis do aspecto apresentado pelo grupo testemunha. Baseados nesta constatação realizou-se um novo bioensaio. Neste, grupos tratados com mel ou com mel contendo Dipel PM<sup>®</sup> na concentração de 1,77% foram comparados a um terceiro que não recebeu alimentação.

Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, tanto entre as fêmeas ( $F = 61,99$ ;  $P < 0,05$ ) quanto entre os machos ( $F = 63,77$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 23). O grupo tratado apenas com mel apresentou a maior longevidade média (fêmeas  $26,64 \pm 4,5$  dias e machos  $33,15 \pm 5,57$  dias). Já adultos do braconídeo tratados com mel contendo o produto à base de Btk apresentaram um nível de longevidade intermediário

(fêmeas  $14,6 \pm 2,47$  dias e machos  $14,35 \pm 2,41$  dias), enquanto os casais que não receberam alimentação foram os menos longevos em média (fêmeas  $6,94 \pm 1,17$  dias e machos  $7,29 \pm 1,23$  dias).



**Figura 23.** Longevidade média ( $\pm$  E. P.) de adultos de *Bracon hebetor* tratados com mel, mel contendo produto à base de Btk (1,77%) e sem alimentação.

SALAMA *et al.* (1991) observaram alterações negativas em vários parâmetros biológicos de adultos de *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) tratados com diferentes concentrações de Dipel PM<sup>®</sup> em solução açucarada. A ingestão do entomopatógeno além de provocar uma redução significativa no número de ovos depositados por fêmea, viabilidade dos ovos, viabilidade do estágio larval e pupal, também reduziu drasticamente a longevidade dos machos.

Com base nestes dados, e no pressuposto de que o Btk é específico para lepidópteros, é possível levantar a hipótese de que apesar de alimentar-se eventualmente no mel contendo Dipel PM<sup>®</sup>, os parasitóides em estudo o fazem com menor frequência ou em menor quantidade talvez devido a um certo nível de inibição causado pelas substâncias

inertes presentes no produto comercial. Desta forma, apesar de sobreviverem por um período maior que aqueles que não se alimentam, apresentam menor longevidade que aqueles outros que tiveram uma fonte de alimentação sem contaminação pelo inseticida microbiano.

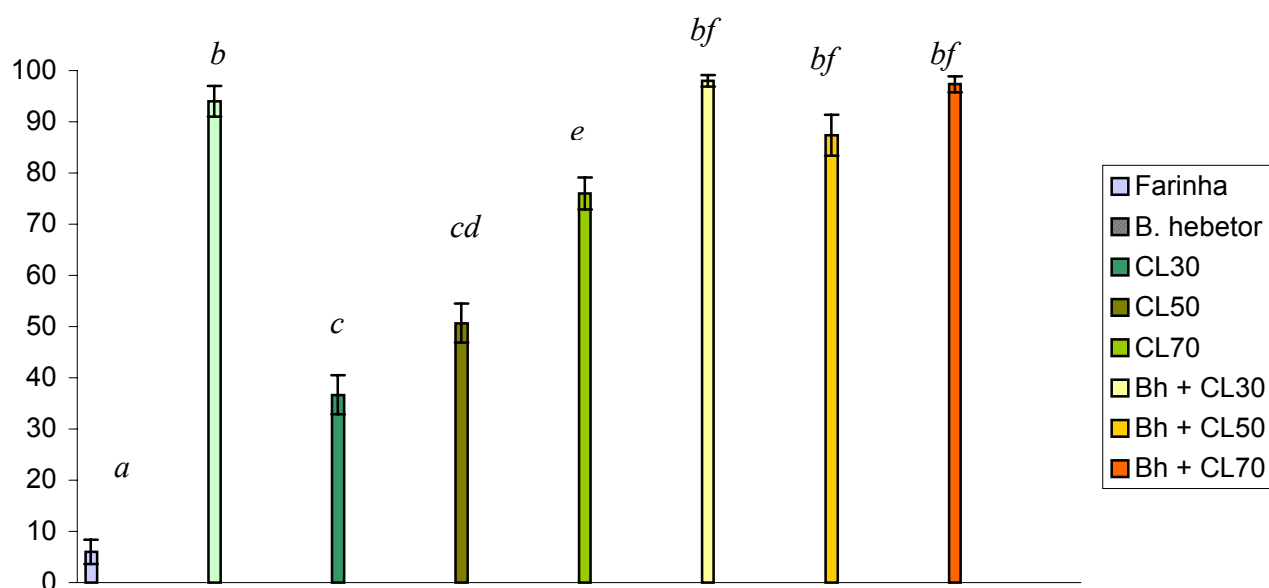
Efeitos diretos deste patógeno sobre o parasitóide podem ser desconsiderados, visto que para a ativação da pró-toxina do *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no intestino médio são necessárias condições de pH alcalino e receptores de membrana específicos, condições típicas de larvas fitófagas de Lepidoptera (BAUER, 1995; HABIB & ANDRADE, 1998). MONNERAT (1995, *apud* MAGALHÃES, 1998) demonstrou a inocuidade do Bt através de análises imunocitoquímicas *in vitro*. As toxinas cryIA(a), cryIA(b) e cry IA(c) produzidas pelo patógeno, usadas em formulações comerciais, contra *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758), praga de crucíferas, não se ligam às células do intestino do parasitóide *Diadegma* sp (Hymenoptera: Ichneumonidae).

### **3.3.3. Efeito da combinação entre Btk e *Bracon hebetor* no controle de *Ephestia kuehniella***

Nas condições laboratoriais e metodológicas adotadas nestes bioensaios, observou-se que o controle pontual de *E. kuehniella* por *B. hebetor* não diferiu estatisticamente dos tratamentos onde se empregou o parasitóide em associação com o produto à base de Btk, em três diferentes concentrações. Mas, foi significativamente superior ao controle obtido somente pelo produto entomopatogênico, já que foram utilizadas concentrações equivalentes às CL<sub>30/90h</sub> (0,52%), CL<sub>50/90h</sub> (1,77%) e à CL<sub>70</sub> (4.82%) para larvas de último estágio do piralídeo (F= 138,85;  $P < 0,01$ ) (Figura 24).

Entretanto, como observado em experimentação apresentada anteriormente quando há contato contínuo entre parasitóides e o Btk, variáveis como a concentração e o tempo de exposição prévia ao entomopatógeno podem influenciar a eficiência do braconídeo. A capacidade de evitar o parasitoidismo em hospedeiros inadequados e a diminuição gradual da capacidade reprodutiva, em decorrência da idade, podem ser compensadas pela ação do patógeno. Desta forma, o controle das larvas do piralídeo foi mais eficiente na associação entre estes dois agentes de controle biológico.

Como já ressaltado, os dois inimigos naturais avaliados neste projeto são ecologicamente homólogos (MAY & HASSELL, 1988; HOCHBERG, 1991) e pelo constatado são também excludentes, já que a ingestão do patógeno acaba por interferir na aceitação e viabilidade do desenvolvimento do parasitóide, e este último, por sua vez, ao paralisar o hospedeiro impede a sua infecção por Btk. Todavia, sua ação de controle acaba por ser complementar.



**Figura 24.** Mortalidade média ( $\pm$  E.P.) de larvas de *Ephestia kuehniella* tratados com diferentes combinações de agentes de controle biológico (*Bracon hebetor* e produto à base de Btk).



Apesar das indicações de que a associação de Btk e *B. hebetor* é bastante favorável para o controle do piralídeo devem ser feitos estudos em campo levando em consideração outras variáveis importantes para o estabelecimento das condições ideais de utilização destes agentes. Tal se baseia no fato de que outros fatores podem interferir nesta associação, como: nível de infestação, tipo de unidade armazenadora, tipo de produto infestado (grãos, sementes, subprodutos), profundidade alcançada pelas larvas na massa do produto, presença de refúgios, método de aplicação do inseticida microbiano, entre outros.

### 3.4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que Btk e *Bracon hebetor* são homólogos e competem por seu hospedeiro, *Ephestia kuehniella*, sendo que apresentam estratégias que levam à exclusão do seu competidor. Desta forma, aquele inimigo natural que primeiro utilizar o hospedeiro, infectando ou parasitoidando, prejudica o desenvolvimento do outro.

Nas condições experimentais empregadas neste trabalho, foi possível constatar que a utilização do entomopatógeno afeta a capacidade reprodutiva do braconídeo, principalmente quando a bacteriose já apresenta sinais evidentes nas larvas hospedeiras, como ocorre em exposições superiores às 72h. Apesar disto, altos níveis de controle de *E. kuehniella* foram alcançados nos tratamentos onde houve a combinação dos agentes de controle.

O produto à base de Btk apresentou efeitos diretos sobre o braconídeo exposto ao formulado em diferentes concentrações, reduzindo consideravelmente sua longevidade. Além disso, a ingestão do patógeno diluído em mel também provocou a mortalidade precoce nos adultos do parasitóide.

Sendo assim, salienta-se que trabalhos em campo devem ainda ser realizados para verificar a influência de outras variáveis para que se possa escolher a melhor estratégia de controle. Todavia, a partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a inserção de produtos à base de Btk e *B. hebetor* em programas de MIP em ambientes de armazenamento pode ser viável.

Duas estratégias podem ser propostas com base no monitoramento das densidades populacionais da praga e do ectoparasitóide no ambiente de armazenamento. Quando populações naturais do braconídeo estivessem ausentes nas unidades armazenadoras ou nos moinhos os dois agentes poderiam ser introduzidos alternadamente, sendo que o produto à base de Btk seria utilizado principalmente para o controle de larvas de primeiro e terceiro estádios de *E. kuehniella*, enquanto *B. hebetor* controlaria as larvas de último estágio. Já no caso de ambientes onde populações do parasitóide estivessem naturalmente presentes o inseticida microbiano poderia ser utilizado esporadicamente, em situações emergenciais onde o braconídeo não estaria mantendo *E. kuehniella* abaixo do nível econômico de dano. Todavia, deve-se lembrar que o controle biológico é apenas um dos métodos que compõem programas de MIP. Outras técnicas devem ser empregadas para aumentar a sua eficiência.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, A. M. et al. Histopathological effects of Biotrol BTB process 183, on third instar larvae of *Anagasta kuehniella* Zeller. **Z. ang. Ent.**, v. 65, n. 1, p. 38-48, 1970.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº74/MS/SNVS, de 4 de agosto de 1994, DOU 05.08.94. Brasília, 1994. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/74\\_94.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/74_94.pdf)>. Acesso em: 27 julho 2002.

\_\_\_\_\_. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, D.O. de 01/08/97. Brasília, 1997. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/326\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/326_97.htm)>. Acesso em: 27 julho 2002.

ATWOOD, D. W.; YOUNG, S. Y. III; KRING, T. J. Development of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera; Braconidae) in tobacco budworm (Lepidoptera; Noctuidae) larvae treated with *Bacillus thuringiensis* and thiodicarb. **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n 3, p. 751-756, 1997.

BAUER, L. S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Fl. Entom.**, v. 78, n. 3, p. 414-443, 1995.

BLUMBERG, D. et al. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) and *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n 5, p. 1181-1186, 1997.

CECÍLIO, A. T. B. **Bioecologia de *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae), ectoparasitóide de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) sob diferentes fotoperíodos, tipos de alimento, idade e densidade de hospedeiro.** 1993. 91f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

DOUTT, R.L. The biology of parasitic Hymenoptera. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 4, n. 1, p. 161-182, 1959.

FLEXNER, J.L.; LIGHTHART, B. & CROFT, C.A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. **Agric. Ecosystems. Environ.**, v. 16, n. 3-4, p. 203-252, 1986.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HOCHBERG, M. E. The potential role of pathogens in biological control. **Nature**, v. 337, n. 6204, p. 262-265, 1989.

\_\_\_\_\_. Extra-host interactions between a braconid endoparasitoid, *Apanteles glomeratus*, and a baculovirus for larvae of *Pieris brassicae*. **J. Animal Ecol.**, v. 60, p. :65-77, 1991.

MAY, R. M.; HASSEL, M. P. Population dynamics and biological control. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 318, n. 1189, p 129-169, 1988.

MAGALHÃES, B. P.; MONNERAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. FEALQ: Piracicaba, 1998. p. 195-216.

MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P. Biologia do ectoparasitóide *Bracon hebetor* Say, 1857 (Hymenoptera: Braconidae) em sete espécies de lepidópteros. **Sci. Agric.**, v. 58, n. 4, p. 693-698, 2001.

METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley & Sons, 1982. 577 p.

MONERRAT, R.G. **Interrelations entre la teigne dès crucifères *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), son parasitoïde *Diadegma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) et la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 1995. 162 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Ecole Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, 1995.

MÜCK, V. O. et al. Zur wirkung von *Bacillus thuringiensis* Berliner auf die parasitischen hymenopteren *Apanteles glomeratus* L. (Braconidae) und *Pimpla turionellae* (L.) (Ichneumonidae). **Z. ang. Ent.**, v. 92, n. 2, p. 303-314, 1981

NEALIS, V. G.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Apanteles fumiferanae* Vier. (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Can. Ent.**, v. 122, n. 7-8, 1990.

RICHARDS, O. W.; THOMSON, W. S. A contribution to the study of genera *Ephestia*, Gn (including *Strymax*, Dyar), and *Plodia*, Gn (Lepidoptera, Phycitidae), with notes on parasites of the larvae. **Philos. Trans. Ent. Soc. Lond.**, v. 80, n. 2, p. 169-250, 1932.

SALAMA, H. S. et al. Parasites and predators of the meal moth *Plodia interpunctella* Hbn. as affected by *Bacillus thuringiensis* Berl. **J. Appl. Ent.**, v. 112, n. 2, p. 244-253, 1991.

\_\_\_\_\_; ZAKI, F. N.; SABBOUR, M. M. Effect of *Bacillus thuringiensis* endotoxin on *Apanteles litae* Nixon and *Bracon instabilis* Marsh. (Hym., Braconidae), two parasitoids of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lep., Gelishiidae). **J. Appl. Entomol.**, v. 120, n 9, p. 565-568, 1996.

SCHÖLLER, M. et al. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **J. Stored Prod. Res.**, v. 33, n. 1, p. 81-97, 1997.

SERRA, H. J. P. **Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879 ) (Lepidoptera: Pyralidae).** 1992. 91 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

SOSA-GÓMEZ, B. P.; MONERRAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. In: ALVES, S. B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 195-216.

TEMERAK, S. A. Detrimental effects of rearing a braconid parasitoid on the pink borer larvae inoculated by different concentrations of bacterium, *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Z. ang. Entom.**, v. 89, n. 3, p. 315-318, 1980.

VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 21, n. 1, p. 109- 133, 1976.

\_\_\_\_\_; IWANTSCH, G. F. Host suitability for insect parasitoids. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 25, n. 1, p. 397-419, 1980.

WALLNER, W. E.; DUBOIS, N. R.; GRINBERG, P. S. Alteration of parasitism by *Rogas lymantriae* (Hymenoptera: Braconidae) in *Bacillus thuringiensis* - stressed gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) hosts. **J. Econ. Entomol.**, v. 76, n. 2, p. 275-277, 1983.

WOLLAM, J. D.; YENDOL, W. G. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and a parasitoid for supression of gypsy moth. **J. Econ. Entomol.**, v. 69, n. 1, p.113-118, 1976.



## **Capítulo 4: CAPACIDADE DE SELEÇÃO DE *Bracon hebetor* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ENTRE LARVAS DE *Ephestia kuehniella* SADIAS E INFECTADAS COM *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, EM LABORATÓRIO.**

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das fêmeas de *Bracon hebetor* distinguirem larvas de *Ephestia kuehniella* sadias de infectadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Para tal foram analisados dois parâmetros do comportamento de seleção de hospedeiros: a localização e a aceitação das larvas hospedeiras. Através de experimentos de dupla escolha, realizados em olfatômetro e em placas de Petri, constatou-se que a infecção pelo patógeno não altera a capacidade de localização do hospedeiro pelo braconídeo, independentemente da concentração e tempo de exposição das larvas de *E. kuehniella* ao produto à base de Btk. O tempo de localização também foi semelhante ao do grupo testemunha, demonstrando a ausência de efeitos adversos decorrentes da presença do patógeno. Todavia, a aceitação das larvas do piralídeo para oviposição foi significativamente reduzida em função do aumento do tempo de exposição. Em bioensaios onde se ofereceram larvas hospedeiras infectadas há 72h a aceitação variou inversamente à concentração aplicada. Tal fato é justificado pela presença de sinais evidentes do desenvolvimento da patologia, que permitem ao parasitóide identificar o hospedeiro como inadequado. Já o grupo de fêmeas de *B. hebetor*, tratado com larvas submetidas a tratamento com o produto à base de Btk por 24h, não apresentou capacidade de seleção. As fêmeas dos tratamentos com o inseticida microbiano e do grupo testemunha não apresentaram diferença significativa entre si em relação à aceitação das larvas hospedeiras, pois neste período o hospedeiro ainda não manifesta sinais da bacteriose.

## 4.1. INTRODUÇÃO

Os odores são parte bastante importante no desempenho de atividades vitais para os insetos. Os infoquímicos, enquanto substâncias vinculadoras de informações, exercem um papel fundamental na mediação de interações intra e interespecíficas, incluindo relações entre os diferentes níveis tróficos (VILELA & DELLA LUCIA, 2001). Todavia, vários fatores intrínsecos ao inseto, assim como relativos ao ambiente, podem afetar a resposta de um indivíduo ao sinal químico.

As larvas de quinto estágio de *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) produzem em suas glândulas mandibulares um feromônio de dispersão (2-acilciclohexano-1,3 diona), o qual é liberado durante a atividade alimentar. Este atua provocando uma resposta fisiológica e comportamental que regula a densidade larval do piralídeo nos focos de infestação, diminuindo a competição intra-específica (CORBET, 1971; VILELA & DELLA LUCIA, 2001).

De acordo com STRAND *et al.* (1989), este mesmo composto atua como caioromônio para parasitóides generalistas, os quais são inimigos naturais de piralídeos pragas de armazéns, como *Bracon hebetor* (Say, 1836) e *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). Este composto teria papel fundamental na localização do hospedeiro, promovendo comportamentos de localização e detenção (“*arrestment*”), movimento de antenas e exploração (“*probing*”). E quando depositado linearmente atua como uma trilha para *B. hebetor*. Todavia, PARRA *et al.* (1996) avaliaram a atratividade de várias fontes de voláteis (dieta não infestada, larvas, excremento e pupas de *E. kuehniella*) para *B. hebetor*, buscando identificar quais seriam os responsáveis pelas respostas de longo alcance. Constataram que a fonte mais atrativa para o parasitóide foi o excremento de larvas de último estágio do piralídeo, sendo que isolaram e testaram em túnel de vento dois compostos ainda não identificados mas que estariam implicados na atração do braconídeo a esta fonte. Estes novos compostos isolados mostraram ser os responsáveis pela atração a longa distância de indivíduos do parasitóide. Desta forma concluíram que o excremento atrai *B. hebetor* para o sítio onde se localizam os hospedeiros e o 2-acilciclohexano-1,3 diona é o responsável por deter o parasitóide na área de infestação do piralídeo e por auxiliar na procura e exploração dos hospedeiros.



Segundo BACH (1964) e VINSON (1976) o processo de seleção de hospedeiros por parasitóides pode ser dividido em 5 categorias: localização do habitat; localização do hospedeiro; aceitação do hospedeiro; adequabilidade do hospedeiro e regulação do hospedeiro. Alterações na condição do inseto, como o desenvolvimento de patogenias, podem comprometer este processo, uma vez que os parasitóides poderiam discriminar aqueles indivíduos doentes na população alvo, evitando a oviposição numa fonte de recurso alimentar imprópria para sua progênie (VINSON & IWANTSCH, 1980; VINSON, 1984). Sendo assim, dentro do contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP), é de extrema importância se conheçam as possíveis alterações no comportamento de parasitóides que são utilizados como agentes de controle biológico juntamente com patógenos.

Tendo em vista a possibilidade da utilização associada de produtos à base de Btk e *B. hebetor* em programas de MIP para o controle de *E. kuehniella*, este trabalho teve como propósito avaliar a capacidade de seleção do parasitóide entre larvas sadias e infectadas do piralídeo.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

A capacidade de *Bracon hebetor* identificar e selecionar larvas sadias e infectadas de *Ephestia kuehniella* por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foi avaliada através da análise de dois processos comportamentais: localização e aceitação das larvas hospedeiras.

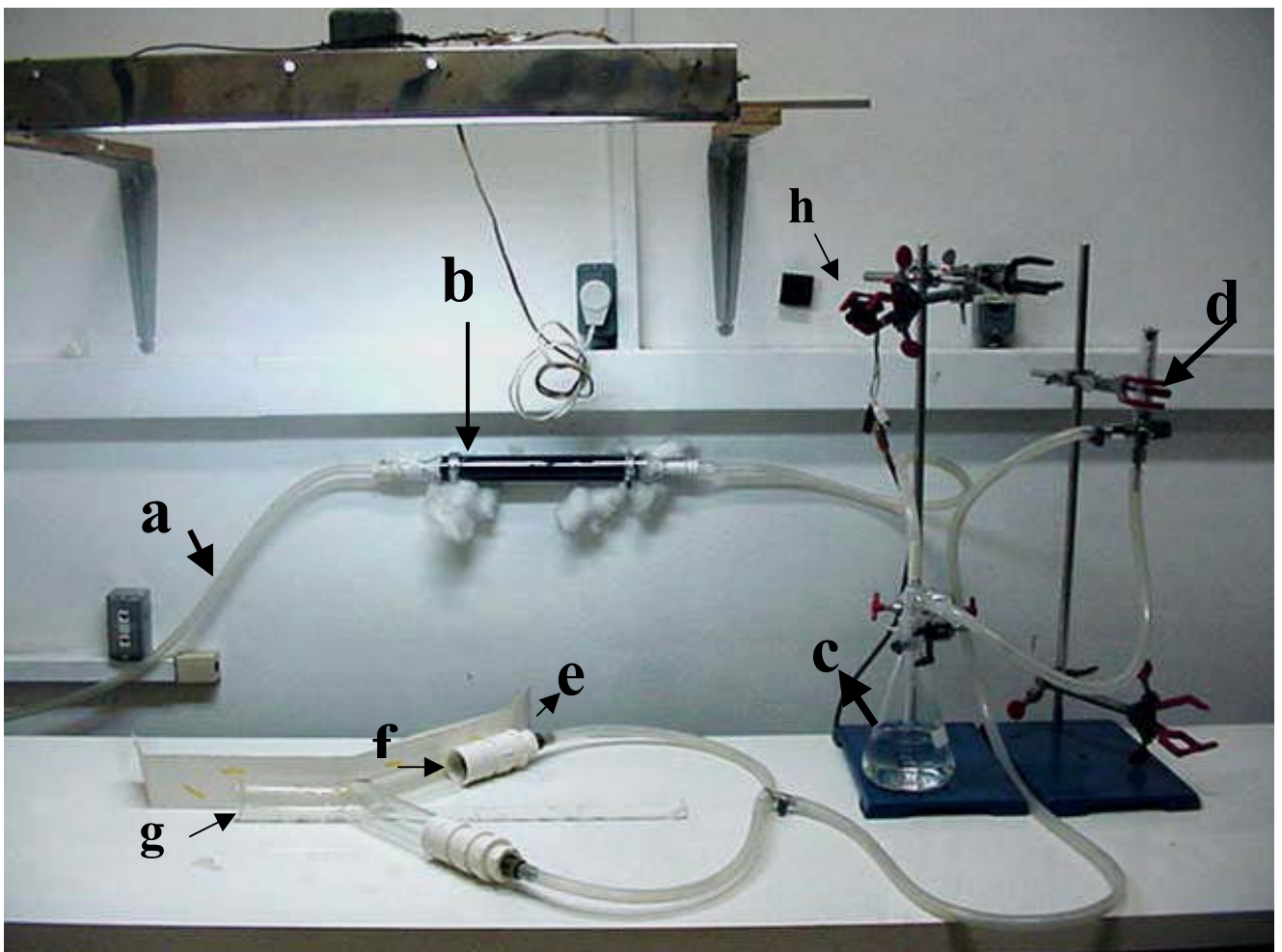
Os bioensaios foram realizados em uma sala exclusiva para experimentos de olfatometria no Laboratório de Entomologia Aplicada (Depto de Zoologia/ UNICAMP), uma vez que estes exigem um espaço isolado, livre de contaminações químicas e perturbações. Os experimentos foram filmados por quatro micro-câmeras de vídeo, ligadas a um “Quad” que enviava as imagens para uma TV na sala de observação anexa, para se evitar interferências de odores e movimento do pesquisador sobre o experimento. As condições laboratoriais foram mantidas em  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e intensidade de luz de 0,4 lux.

**4.2.1. Capacidade de localização de larvas de último estágio de *E. kuehniella*, sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por *B. hebetor*:**

A localização do hospedeiro por fêmeas de *B. hebetor* foi avaliada em duas situações:

**4.2.1.1. em olfatômetro de dupla escolha (Tubo de vidro em Y):**

Inicialmente, foram realizados procedimentos para a calibração do olfatômetro (Figura 25).



**Figura 25.** Olfatômetro de dupla escolha, em “Y” (a: conexão com o compressor de ar; b: filtro de carvão ativado; c: umidificador de ar; d: fluxômetro; e: câmara de liberação do estímulo; f: tela de separação entre estímulo e braço do olfatômetro; g: local de liberação do parasitóides; h: micro-câmera)

Para tal, realizou-se um teste de fumaça visando regular a velocidade do ar dentro do instrumento, bem como verificar sua distribuição e formato. Os testes foram feitos utilizando-se ácido acético e hidróxido de amônia para produção de fumaça branca (EIRAS & MAFRA NETO, 2001). A velocidade foi estimada provocando-se pequenas distorções na pluma de fumaça (30 repetições/ braço do olfatômetro), que eram acompanhadas por uma distância pré-determinada e tinham o tempo de percurso registrado em cronômetro digital. A velocidade final adotada para os bioensaios foi de 7,30 cm/s (PARRA *et al.*, 1996).

Posteriormente à calibração, as avaliações da capacidade de localização de larvas hospedeiras doentes e sadias por *B. hebetor* foram realizadas. Foram estabelecidos quatro tratamentos com diferentes estímulos olfativos para o parasitóide. Estes consistiam em um grumo de farinha misturada a Dipel PM<sup>®</sup> na concentração de 4,82%, contendo 5 larvas de último estágio de *E. kuehniella*, expostas ao agente microbiano por 4 períodos de tempo (0, 24, 48 ou 90 horas). Em um dos braços do olfatômetro se inseriu um dos estímulos olfativos, enquanto o braço oposto permaneceu vazio (branco).

Fêmeas de *B. hebetor* (n=30/ tratamento), com idades de 3 a 5 dias, acasaladas e com experiência prévia de oviposição (PARRA *et al.*, 1996), foram, então, liberadas individualmente no braço central do olfatômetro. O deslocamento do braconídeo até a parte final de um dos braços do olfatômetro foi observado através das imagens geradas pelas micro-câmeras em monitor de TV. Cada fêmea foi liberada uma única vez no aparelho. Considerou-se a resposta do parasitóide como positiva quando este permanecia por mais de 10 segundos na tela que separava a câmara de liberação de estímulo do braço do olfatômetro (Figura 25 f). O tempo para alcançar o estímulo também foi registrado com cronômetro digital.

A cada cinco liberações todo o material utilizado era lavado em detergente neutro (Extran<sup>®</sup>) a 5% e secado com corrente de ar (secador). Também se alternou o braço de liberação do estímulo a cada 5 repetições para se monitorar e evitar possíveis tendenciosidades na resposta.

#### **4.2.1.2. em placas de Petri:**

Foi também realizado um teste de dupla escolha em placas de Petri para averiguar a capacidade de seleção de *B. hebetor* entre larvas sadias e sujeitas à infecção por Btk. Neste foram retirados da criação matriz do piralídeo grupos de cinco larvas de

último estágio de *E. kuehniella*, os quais foram submetidos por 72 horas a tratamento com:

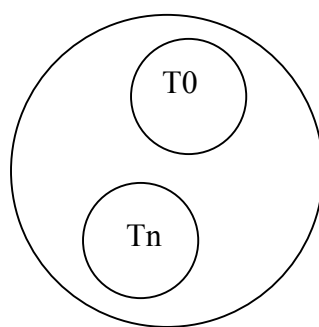
- farinha de trigo integral (T0),
- farinha de trigo integral com Dipel PM<sup>®</sup> a 0,52% (T1);
- farinha de trigo integral com Dipel PM<sup>®</sup> a 1,77% (T2);
- farinha de trigo integral com Dipel PM<sup>®</sup> a 4,82% (T3).

Posteriormente, os grumos (estímulos olfativos) formados pelas larvas de cada tratamento foram transferidos para placas de plástico pequenas (3 x 1 cm).

Cada fêmea do braconídeo (n=30/ combinação de tratamentos) (3 a 5 dias e com experiência prévia) foi liberada em uma placa de Petri (14cm) contendo 2 das placas pequenas (Figura 26), sendo sempre uma pertencente ao grupo T0 e o outro podendo ser do grupo T1, T2 ou T3.

Os indivíduos do parasitóide foram observados até que entrasse em contato com um dos estímulos e permanecesse nele por mais de 10 segundos. Em seguida tanto os estímulos quanto o braconídeo eram retirados da placa de Petri e descartados.

A cada liberação todo o material utilizado era lavado em detergente neutro (Extran<sup>®</sup>) a 5% e secado em estufa a 40<sup>0</sup>C. As placas foram posicionadas aleatoriamente em relação à fonte de luz da sala.



**Figura 26.** Esquema ilustrativo do experimento de dupla escolha (T0= larvas de *E. kuehniella* em grumo de farinha de trigo integral não tratado com Dipel PM<sup>®</sup>; Tn= larvas de *E. kuehniella* em grumo de farinha de trigo integral tratado com Dipel PM<sup>®</sup>).

#### **4.2.2. Aceitação de larvas de último estágio de *E. kuehniella*, sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por *B. hebetor*.**

Também se realizou um experimento para avaliar a aceitação das larvas hospedeiras de *E. kuehniella* pelo braconídeo quando sujeitas a tratamento com Dipel PM® em três diferentes concentrações (em farinha de trigo integral 0,52%; 1,77% ou 4,82%) e dois tempos de exposição (24 ou 72 horas). Neste, para cada uma das fêmeas (com 3 a 5 dias de idade e experiência prévia de parasitoidismo) que compunham o tratamento foi oferecida uma larva de último estágio de *E. kuehniella*, em frascos plásticos vedados (80ml) (n=20/ repetição; 2 repetições por tratamento).

Após 24 horas, as fêmeas do parasitóide foram retiradas dos frascos. Então, as larvas do piralídeo foram examinadas e se registrou a aceitação ou rejeição do hospedeiro em função da presença ou ausência de ovos.

Foram realizadas observações também em dois grupos testemunhas, onde as larvas do piralídeo oferecidas a *B. hebetor* como sítio de oviposição tiveram contato com farinha de trigo integral sem adição do inseticida microbiano por 24 ou 72 horas.

#### **4.2.3. Análise dos dados**

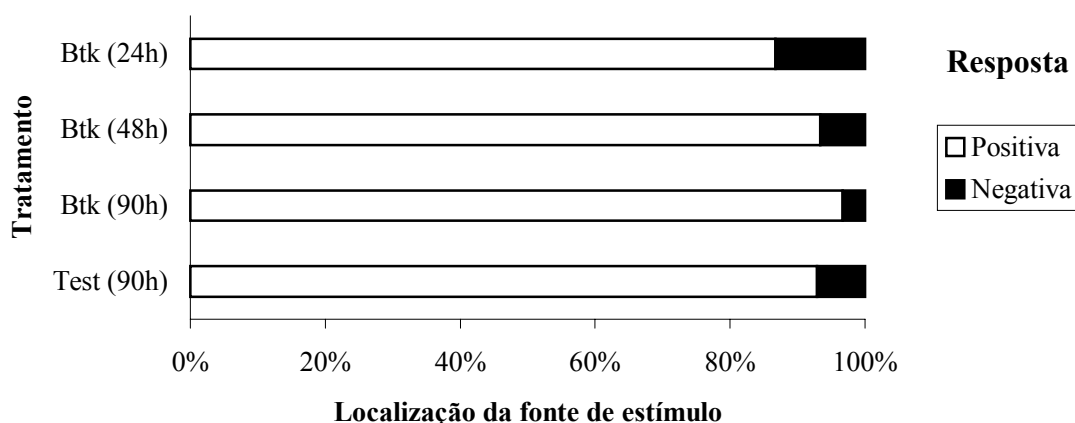
Para a análise dos dados foram empregados o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

### **4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1. Capacidade de localização de larvas de último estágio de *E. kuehniella*, sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por *B. hebetor*:**

##### **4.3.1.1. em olfatômetro de dupla escolha (Tubo de vidro em Y):**

As fêmeas do parasitóide foram atraídas por todos os estímulos olfativos apresentados (Figura 27). Em todos os tratamentos avaliados houve um alto índice de localização da fonte de odor, independentemente da presença do produto à base de Btk e do tempo de exposição das larvas do piralídeo (testemunha (90h)  $\chi^2= 22,53$ ,  $P< 0,05$ ; Btk (24h)  $\chi^2= 16,13$ ,  $P< 0,05$ ; Btk (48h)  $\chi^2= 22,53$ ,  $P< 0,05$ ; Btk (90h)  $\chi^2= 26,13$ ,  $P< 0,05$ ). Apenas um número insignificante de fêmeas de *B. hebetor* optou pelo braço do olfatômetro que não apresentava um estímulo olfativo (branco).



**Figura 27.** Localização por fêmeas de *Bracon hebetor* de estímulos olfativos compostos por grumos de farinha integral com produto à base de Btk (4,82%) e larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, em três tempos de exposição (n= 30/ tratamento).

O tempo despendido pelas fêmeas para a localização da fonte de odor também não variou significativamente entre os tratamentos avaliados ( $F= 1,353$ ,  $P= 0,261$ ). Em geral os parasitóides levaram cerca de 2 minutos, em média, para percorrer a distância entre o local de liberação e os estímulos (Testemunha (24h) =  $91,47 \pm 8,31s$ ; Btk (24h) =  $133,23 \pm 21,80s$ ; Btk (48h) =  $117,43 \pm 15,04s$ ; Btk (90h) =  $128,73 \pm 16,29s$ ) (Tabela 26).

**Tabela 26.** Tempo de localização (em segundos) por fêmeas de *Bracon hebetor* de estímulos olfativos, compostos por grumos de farinha integral com produto à base de Btk (4,82%) e larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella* em três tempos de exposição (n= 30/ tratamento).

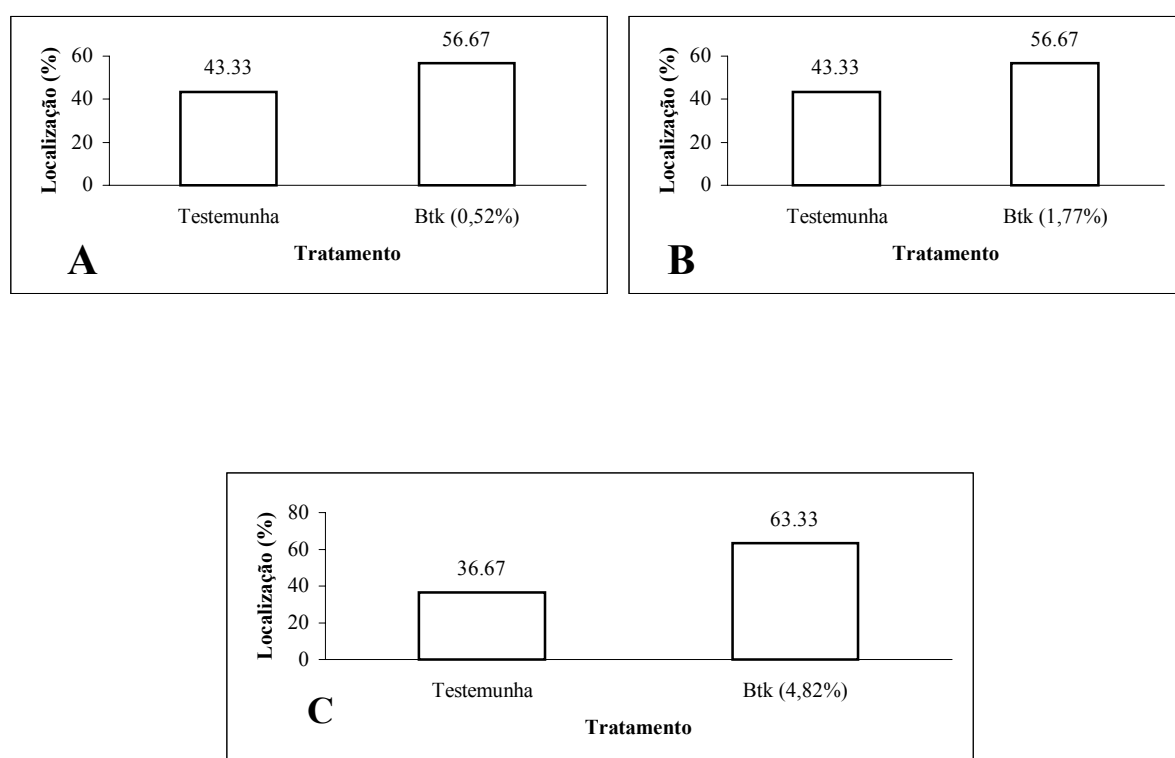
	Tratamento (s)			
	Testemunha	Btk (24h)	Btk (48h)	Btk (90h)
<b>Tempo (s)</b>				
<b>(média ± E. P.)</b>	91,47 ± 8,31 a	133,23 ± 21,80 a	117,43 ± 15,04 a	128,73 ± 16,29 a

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 95\%$ ).

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se observar que o produto comercial à base do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* não interfere na localização a longa distância das larvas de *E. kuehniella* por *B. hebetor*.

#### 4.3.1.2. em placas de Petri:

Os resultados obtidos em experimentos com olfatômetro são reforçados pelas observações feitas em situação de dupla escolha, em placas de Petri, onde foram oferecidos dois estímulos diferentes ao parasitóide, simultaneamente (Figura 28).



**Figura 28.** Resposta de fêmeas de *Bracon hebetor*, em situação de dupla escolha, a estímulos olfativos compostos por larvas de *Ephestia kuehniella*, tratadas por 72h com produto à base de Btk nas concentrações de 0,52% (A), 1,77% (B) e 4,82% (C) (n= 30/ tratamento).

Neste caso foi possível constatar que a orientação das fêmeas não sofreu interferência da concentração de Dipel PM<sup>®</sup>, pois não se observou uma tendência de direcionamento preferencial a qualquer dos estímulos oferecidos (testemunha *versus* Btk (0,52%)  $\chi^2 = 0,533$ ,  $P = 0,465$ ; testemunha *versus* Btk (1,77%)  $\chi^2 = 0,533$ ,  $P = 0,465$ ; testemunha *versus* Btk (4,82%) = 2,133 ,  $P = 0,144$ ) (Figura 28 A, B e C, respectivamente).

#### 4.3.2. Aceitação de larvas de último estágio de *E. kuehniella*, sadias ou sujeitas a tratamento com produto à base de Btk, por *B. hebetor*.

Em relação à aceitação por *B. hebetor* de larvas hospedeiras tratadas por 24 horas com uma das três concentrações de Dipel PM<sup>®</sup>, constatou-se que a porcentagem de larvas tratadas aceitas não diferiu entre o grupo testemunha (larvas sadias) e os grupos que tiveram contato com o Btk ( $F = 0,444$ ,  $P = 0,734$ ) (Tabela 27).

**Tabela 27.** Aceitação por *Bracon hebetor*. de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, tratadas com produto à base de Btk em diferentes concentrações por 24 horas.

Concentração (%)	Número de larvas aceitas (média $\pm$ E.P.)
Testemunha	19,50 $\pm$ 0,50 <i>a</i>
0,52%	19,50 $\pm$ 0,50 <i>a</i>
1,77%	20,00 $\pm$ 0,00 <i>a</i>
4,82%	19,00 $\pm$ 1,00 <i>a</i>

- Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 95\%$ ).
- n= 20/ repetição; 2 repetições/ tratamento.

Já nos grupos tratados por 72h observa-se que a utilização de Dipel PM<sup>®</sup> aumentou significativamente a rejeição das larvas do piralídeo, independentemente da concentração utilizada ( $F = 11,984$ ,  $P = 0,018$ ) (Tabela 28).



**Tabela 28.** Aceitação por *Bracon hebetor*. de larvas de último estágio de *Ephestia kuehniella*, tratadas com produto à base de Btk em diferentes concentrações por 72h.

Concentração (%)	Número de larvas aceitas (média ± E.P.)
Testemunha	19,00 ± 1,00 <i>a</i>
0,52%	15,00 ± 1,00 <i>b</i>
1,77%	13,00 ± 1,00 <i>b</i>
4,82%	9,50 ± 1,50 <i>b</i>

- Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 95\%$ ).
- n= 20/ repetição; 2 repetições/ tratamento.

Tendo em vista os dados obtidos observa-se, então, que a introdução do produto à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para o controle de *E. kuehniella* não interfere na dinâmica de localização das larvas hospedeiras por *B. hebetor*. O odor liberado pelo produto formulado não promove rejeição pelo parasitóide, nem altera seu tempo de resposta ao hospedeiro. O desenvolvimento gradual da patogenia permite que as larvas do pirálídeo tenham atividade alimentar e de defecação antes de sua morte, em todas as concentrações e tempos de exposição empregados. A presença dos excrementos garantiria a atração necessária para que o parasitóide viesse a buscar por hospedeiros, mesmo estes estando em presença do inseticida microbiano. Entretanto, com o decorrer do tempo, o desenvolvimento da patogenia pelas larvas e o impacto das concentrações empregadas facilitam a sua identificação como um hospedeiro inadequado, implicando na seleção do hospedeiro, aumentando a rejeição pelo parasitóide.

Já a falta de sinais perceptíveis pelo braconídeo no início da patogenia pode levá-lo a depositar ovos em hospedeiros infectados ainda assintomáticos, o que compromete o desenvolvimento de sua prole, e pode alterar parâmetros populacionais.

De acordo com BROOKS (1993, *apud* SCHOENMAKER *et al.*, 2001) vários parasitóides apresentam preferência por hospedeiros sadios quando estes são apresentados em condição de escolha juntamente com hospedeiros portadores de patologias causadas por vírus, fungos ou bactérias, em condições de laboratório.

SOUZA & VIANA-BAILEZ (2001) demonstraram que fêmeas de *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) são capazes de identificar larvas de *Diatrea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) contaminadas com o fungo *Beauveria bassiana* há mais de 12h.

O parasitóide *Trasonema rostrale rostrale* (Brishke) (Hymenoptera: Ichneumonidae) mostrou-se capaz de distinguir entre larvas de quarto estágio de *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) não tratadas e tratadas com o produto comercial Foray 48B, à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em teste de escolha. As fêmeas foram capazes de detectar e evitar larvas que apresentavam efeitos letais da infecção microbiana, e em menor proporção, larvas que sobreviveram à exposição ao patógeno (SCHOENMAKER *et al.*, 2001).

A rejeição de larvas infectadas pelos parasitóides apresenta uma vantagem seletiva bastante óbvia, pois evita que estes percam um investimento energético em produzir prole em um hospedeiro que não garanta o sucesso no seu desenvolvimento. *B. hebetor*, no presente trabalho, apresenta uma capacidade limitada de discriminação de larvas infectadas por Btk, a qual está condicionada ao tempo de desenvolvimento da patogenia no seu hospedeiro. Desta forma, a associação deste braconídeo com produtos à base de Btk para o controle de *E. kuehniella*, apesar de possível, deve levar em conta tal comportamento para que as populações do parasitóide não tenham seu desempenho prejudicado.

#### 4.4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que o micro-himenóptero *Bracon hebetor* apresenta capacidade de selecionar, entre larvas sadias e infectadas por Btk, aquelas que apresentam melhores condições de satisfazer suas exigências reprodutivas, em certas circunstâncias.

Foi possível constatar que os braconídeos não alteram seu comportamento de localização em função da presença do produto à base de Btk e de larvas infectadas. Todavia, os mecanismos que permitem reconhecer e aceitar o hospedeiro adequado propiciam ao parasitóide a capacidade de rejeitar aqueles que apresentam sinais evidentes da infecção pelo patógeno. O tempo decorrido desde o início da exposição das larvas de *E. kuehniella* a tratamento com o inseticida microbiano é um fator bastante

importante neste aspecto, pois se observou que a rejeição ocorre somente em fases mais avançadas da bacteriose.

Desta forma, a inserção de produtos à base de Btk e *B. hebetor* em programas de MIP visando o controle de *E. kuehniella* é possível, porém sugere-se que suas introduções em sistemas de armazenagem sejam alternadas.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROOKS, W. M. Host-parasitoid-pathogen interactions. In: BECKAGE, N. E.; THOMPSON, S. N.; FEDERICI, B. A. (eds.). **Parasites and Pathogens of Insects**. New York: Academic Press, 1993. p. 231-272.

CORBET, S. A. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella* contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in an hymenopteran parasite. **Nature**, v 232, p. 481-484, 1971

BACH, P. **Biological control of pests and weeds**. New York: Chapman & Hall, 1964. 246 p.

EIRAS, A. E.; MAFRA NETO, A. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. In: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M.C. (eds.). **Feromônios de insetos**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2001. p. 27-39.

PARRA, J. R. P. et al. Flight response of *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) in a wind tunnel to volatiles associated with infestations of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Biol. Control**, v. 6, n. 2, p. 143-150, 1996.

SCHOENMAKER, A.; CUSSON, M.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and parasitoids of late instar larvae of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Can. J. Zool.**, v. 79, p.1697-1703, 2001.

STRAND, M.R. et al. Kairomonal activities of 2-acylcyclohexane-1,3 diones produced by *Ephestia kuehniella* Zeller in eliciting searching behavior by the parasitoid *Bracon hebetor* (Say). **J. Chem. Ecol.**, v. 15, n. 5, p. 1491-1500, 1989.

SOUZA, C. L. M.; VIANA-BAILEZ, A. M. Capacidade de *Cotesia flavipes* (Hym., Braconidae) em discriminar larvas de *Diatrea saccharalis* infectadas com *Beauveria bassiana*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, Poços de Caldas, 2001. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2001. p. 94.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M.C. (eds.). **Feromônios de insetos**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2001. 206 p.

VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 21, n. 1, p. 109- 133, 1976.

\_\_\_\_\_. Parasitoid – host relationship. In: BELL, W. J.; CARDÉ, R. T. (eds.). **Chemical Ecology of Insects**. Boston: Chapman & Hall. 1984. p. 205-233.

\_\_\_\_\_; IWANTSCH, G. F. Host suitability for insect parasitoids. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 25, n. 1. p. 397-419, 1980.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A susceptibilidade de *Ephestia kuehniella* ao produto à base de Btk variou inversamente ao estágio larval tratado. Desta forma, as larvas no primeiro ínstar foram as mais susceptíveis à ação do patógeno.
- O sexo das larvas de *E. kuehniella* não é um fator que influencia a susceptibilidade ao patógeno, logo não apresenta relevância para os programas de MIP deste piralídeo.
- A idade das larvas de *E. kuehniella* no momento do tratamento, a concentração empregada e o período de exposição ao produto à base de Btk são fatores bastante importantes na determinação dos efeitos crônicos nas sobreviventes. Mesmo em concentrações subletais, a exposição ao inseticida microbiano diminuiu a viabilidade dos estágios imaturos sobreviventes e aumentou o tempo de duração do desenvolvimento das larvas de primeiro estágio, sobreviventes ao tratamento. Os adultos sobreviventes à bacteriose apresentaram diminuição na capacidade reprodutiva apenas quando tratados durante o quinto estágio larval.
- *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Bracon hebetor* são espécies competidoras por *E. kuehniella*, apresentando estratégias de exclusão competitiva. Desta forma, aquele inimigo natural que primeiro utilizar o hospedeiro, infectando ou parasitoidando, impede o desenvolvimento do outro. Assim, a utilização do entomopatógeno afeta a capacidade reprodutiva e de sobrevivência da progênie do braconídeo, principalmente quando a bacteriose se encontra em fase avançada. Sinais evidentes da patogenia, apresentados em exposições superiores a 72h, auxiliam na identificação do hospedeiro como não adequado e, em consequência, provocam alterações negativas na capacidade reprodutiva das fêmeas de *B. hebetor*. Apesar disto, atuam de maneira complementar no controle, pois altos níveis de controle de *E. kuehniella* foram alcançados nos tratamentos onde houve a combinação dos agentes de controle.

- Componentes, presentes no produto comercial à base de Btk utilizado neste trabalho, apresentaram efeitos adicionais diretos sobre *E. kuehniella* e *B. hebetor* reduzindo sua longevidade. No piralídeo o impacto pode ser considerado sexo-dependente, pois os machos demonstraram maior sensibilidade às concentrações do Btk. Todavia, em presença do produto puro, a resposta dos dois sexos foi semelhante.
- O produto microbiano, oferecido diluído em mel, também provocou a mortalidade precoce nos adultos do parasitóide.
- *B. hebetor* apresenta capacidade de selecionar entre larvas sadias e infectadas por Btk aquelas que apresentam melhores condições de satisfazer suas exigências reprodutivas. As fêmeas do braconídeos não alteram seu comportamento de localização em função da presença do Btk e de larvas infectadas. Todavia, os mecanismos que permitem reconhecer e aceitar o hospedeiro adequado propiciam ao parasitóide a capacidade de rejeitar apenas aqueles que apresentam sinais da infecção pelo patógeno, sendo assim, o tempo de exposição das larvas de *E. kuehniella* ao Btk é um fator bastante importante.
- Salienta-se que trabalhos em campo devem ainda ser realizados para verificar a influência de outras variáveis para que se possa escolher a melhor estratégia de controle de *E. kuehniella*. Todavia, a inserção de produtos à base de Btk e *B. hebetor* em programas de MIP deste piralídeo, em ambientes de armazenamento, pode ser viável quando utilizados alternadamente, sendo o patógeno mais adequado para o controle do primeiro estágio larval, visto que este apresenta menor susceptibilidade ao patógeno. Já a utilização do parasitóide deve visar o controle de larvas de último estágio. Em ambientes onde populações do parasitóide estejam naturalmente presentes o inseticida microbiano pode ser empregado esporadicamente, em situações emergenciais onde o braconídeo não esteja mantendo *E. kuehniella* abaixo do nível econômico de dano. Sendo assim, os programas de MIP devem adotar técnicas de monitoramento que permitam inferir de forma adequada o momento ideal para a aplicação ou liberação de cada um dos inimigos naturais para que estes possam atuar de maneira complementar no controle de *E. kuehniella*.

- Apesar dos resultados positivos advindos da associação de *Bracon hebetor* com produtos à base de Btk cabe ressaltar que o controle biológico é apenas um dos métodos que compõem programas de MIP, sendo que para se obter resultados satisfatórios no controle de pragas em ambientes de armazenamento, outras técnicas compatíveis devem ser utilizadas.